



TITLE:

オリゴマー蛋白質の構造形成反応  
に関する研究 - 構造形成反応にお  
けるシャペロニン蛋白質GroEの役  
割( Dissertation\_全文 )

AUTHOR(S):

溝端, 知宏

---

CITATION:

溝端, 知宏. オリゴマー蛋白質の構造形成反応に関する研究 - 構造形成  
反応におけるシャペロニン蛋白質GroEの役割. 京都大学, 1995, 博士(理  
学)

ISSUE DATE:

1995-07-24

URL:

<https://doi.org/10.11501/3105590>

RIGHT:

②

## 学位申請論文

論文題目：

オリゴマー蛋白質の構造形成反応に関する研究  
ー構造形成反応におけるシャペロニン蛋白質GroEの役割ー

申請者 溝端 知宏

京都大学大学院

理学研究科（化学専攻）

博士後期課程

（平成6年3月末日退学）

## § 目次

### § 1. 序論

1 - A. はじめに	1
1 - B. 蛋白質の立体構造の静的側面	1
1 - C. 蛋白質の立体構造の動的側面 - 蛋白質フォールディング	
1 - C - 1. 熱力学的考察	5
1 - C - 2. 速度論的考察	9
1 - C - 3. 蛋白質の高次構造形成に関するモデル	11
1 - C - 4. 蛋白質の四次構造形成の位置付け - フォールディング とアソシエーション (Association) の関係	16
1 - D. <i>In vitro</i> フォールディングの研究と <i>in vivo</i> フォールディングの研究, その類似点及び相違点	17
1 - E. 蛋白質フォールディングを触媒する蛋白質 - PPIase と PDI	18
1 - F. 蛋白質フォールディングを補助する蛋白質 - 熱ショック蛋白質とモレキュラーシャペロン	20
1 - F - 1. Hsp27/28 ファミリー	23
1 - F - 2. Hsp90 ファミリー	23
1 - F - 3. Hsp70 ファミリー	25
1 - F - 4. Hsp60/10 ファミリー - 大腸菌由来 GroEL・GroES蛋白質を中心に	28
1 - G. 本研究の標的蛋白質その 1 : トリプトファナーゼについて	38
1 - H. 本研究の標的蛋白質その 2 : ホスホエノールピルビン酸 カルボキシラーゼ (PEPC) について	39
1 - I. 本研究の流れ及び主要な成果	40

### § 2. 材料と方法

2 - A. 試薬	41
2 - B. 測定機器	42
2 - C. 使用菌株ならびにプラスミド	43
2 - D. 細胞の培養	43
2 - E. 蛋白質の精製	44

2-F. 蛋白質濃度決定法	46
2-G. 活性測定法	47
2-H. トリプトファナーゼの自発的フォールディング反応に関する実験	
2-H-1. トリプトファナーゼのアポ型・ホロ型・還元 固定型酵素の作成	47
2-H-2. トリプトファナーゼの変性反応	48
2-H-3. 変性トリプトファナーゼの自発的フォールディング反応	49
2-I. シャペロニン存在下におけるトリプトファナーゼ のフォールディング反応	
2-I-1. フォールディング反応	50
2-I-2. 構造形成中のアグリゲーションの測定 ー蛍光散乱光測定	50
2-I-3. GroELによるヌクレオチド加水分解量の測定 ーLanzettaの比色検定法	51
2-I-4. トリプトファナーゼの再生反応を用いたヌクレオチド に対するGroELの親和性の測定	52
2-J. GroELの変性反応に関する実験	
2-J-1. 蛍光スペクトル変化により観測するGroELの変性反応	52
2-J-2. CDスペクトル変化によるGroELの変性反応の解析	53
2-J-3. GroELの熱安定性に関する実験：ATPアーゼ活性の測定	53
2-J-4. GroELの変性に伴う四次構造変化に関する実験： ゲル濾過クロマトグラフィー分析	54
2-J-5. GroELの変性反応の可逆性の確認	55
2-K. シャペロニン存在下でのPEPCのフォールディング反応に関する実験	
2-K-1. シャペロニン存在下のPEPCの フォールディング反応	55
2-K-2. 構造形成中のアグリゲーションの測定： 光散乱強度の測定	56
§ 3. 結果	
3-A. トリプトファナーゼの自発的変性・フォールディング反応	
3-A-1. トリプトファナーゼの蛍光スペクトル	57
3-A-2. トリプトファナーゼの変性反応ー 蛍光スペクトル変化による解析	58



3-A-3. トリプトファナーゼの構造安定性—補酵素結合の寄与 . . .	62
3-A-4. トリプトファナーゼの自発的フォールディング反応 . . . . .	63
3-B. シャペロニン存在下でのトリプトファナーゼのフォールディング反応	
3-B-1. 活性測定によるフォールディング反応の解析 . . . . .	66
3-B-2. GroEのヌクレオチド特異性に関する実験 . . . . .	70
3-C. GroELの変性反応に関する実験 . . . . .	73
3-C-1. GroELの熱安定性 . . . . .	74
3-C-2. 蛍光スペクトル変化の解析によるGroELの変性反応 . . . . .	75
3-D. シャペロニン存在下でのPEPCのフォールディング反応 . . . . .	79
§ 4. 考察	
4-A. トリプトファナーゼの変性反応 . . . . .	84
4-B. トリプトファナーゼの自発的フォールディング反応 . . . . .	87
4-C. シャペロニン存在下でのトリプトファナーゼのフォールディング反応	
4-C-1. トリプトファナーゼのフォールディング反応に対する GroEの効果—一般的な考察— . . . . .	90
4-C-2. トリプトファナーゼのフォールディング反応に対する GroEの効果—ヌクレオチドの役割— . . . . .	93
4-D. GroELの変性反応 . . . . .	97
4-E. シャペロニン存在下でのPEPCのフォールディング反応 . . . . .	99
4-F. GroEの作用機構・総論 . . . . .	104
§ 謝辞 . . . . .	107
§ 参考文献 . . . . .	108

## § 田各言吾について

本研究では以下の略語を使用した。

ADP : アデノシン 5' - ニリン酸 (Adenosine 5'-diphosphate)

AMP-PNP : 5' - アデニリルイミドニリン酸 (5'-adenylylimidodiphosphate)

ANS : 1 - アニリノナフタレン - 8 - スルホン酸 (1-anilinonaphtalene-8-sulfonate)

ATP : アデノシン 5' - 三リン酸 (Adenosine 5'-triphosphate)

ATP- $\gamma$ -S : アデノシン 5' - O - (3 - チオ三リン酸)  
(Adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate))

Bis : *N, N'* - メチレンビスアクリルアミド (*N, N'*-methylenebisacrylamide)

BSA : 牛血清アルブミン (Bovine Serum Albumin)

CD : 円偏光二色性 (Circular Dichroism)

CoASAc : アセチルコエンザイム A (Acetyl Coenzyme A)

CoASH : コエンザイム A (Coenzyme A)

DHFR : ジヒドロ葉酸還元酵素 (Dihydrofolate Reductase)

DTNB : 5, 5' - ジチオビス (2 - ニトロ安息香酸)  
(5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic Acid))

DTT : ジチオスレイトール (Dithiothreitol)

EDTA : エチレンジアミン四酢酸 (Ethylenediaminetetraacetic Acid)

ER : 小胞体 (Endoplasmic Reticulum)

FKBP : FK506 結合蛋白質 (FK506 Binding Protein)

Gdn-HCl : 塩酸グアニジン (Guanidine Hydrochloride)

HEPES : *N* - [2 - ヒドロキシエチル] ピペラジン - *N'* - [2 - エタンスルホン酸]  
(*N*-[2-hydroxyethyl]piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonate])

HPLC : 高性能液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography)

Hsp : 熱ショック蛋白質 (Heat Shock Protein)

LDH : 乳酸脱水素酵素 (Lactate Dehydrogenase)

MDH : リンゴ酸脱水素酵素 (Malate Dehydrogenase)

NADH : 還元型  $\beta$  - ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド  
( $\beta$ -Nicotinamide Adenine Dinucleotide; Reduced Form)

NMR : 核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance)

PAGE : ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

PDI : プロテインジスルフィドイソメラーゼ (Protein Disulfide Isomerase)

PEG : ポリエチレングリコール 4 0 0 0 (Polyethylene Glycol 4000)

PEP : ホスホエノールピルビン酸 (Phosphoenolpyruvate)

PEPC : ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ  
(Phosphoenolpyruvate Carboxylase)

PLP : ピリドキサル 5' -リン酸 (Pyridoxal 5'-Phosphate)

PPIase : ペプチジル-プロリルシス/トランスイソメラーゼ  
(Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerase)

Rubisco : リブリースビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ  
(Ribulosebisphosphate Carboxylase/Oxygenase)

SDS : ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium Dodecyl Sulfate)

SOPC : S - (o-ニトロフェニル) -L-システイン (S-(*o*-nitrophenyl)-L-cysteine)

TCA : トリクロル酢酸 (Trichloroacetic Acid)

TEMED : N, N, N', N' , -テトラメチルエチレンジアミン  
(N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine)

Tris ; トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)

※アミノ酸の記号は一文字表記, または三文字表記を用いた。

※本研究で “GroEL” とはサブユニット分子量57,000のGroEL蛋白質が14分子会合したものの, “GroES” はサブユニット分子量約10,000のGroES蛋白質が7分子会合したものを指し, この二種類のオリゴマー蛋白質が会合した状態を “GroE” , または “GroE複合体” と呼ぶ。

## § 1. 序論

### 1-A. はじめに

アミノ酸がペプチド結合を介して形成する蛋白質は溶液中ではきわめて複雑な立体構造を形成することが知られている。この立体構造は蛋白質を構成するアミノ酸残基の主鎖及び側鎖の間の様々な相互作用，そしてポリペプチド鎖の直線的な構造に由来する立体的な拘束要因などに規定されて形成される。個々のアミノ酸の間の相互作用が蛋白質の立体構造を規定する重要な要因であるため，ポリペプチド鎖のアミノ酸配列が異なると形成される立体構造も変化することが予想される。蛋白質の生理的機能はその立体構造により生み出されていると言っても過言ではなく，細胞内の無数にある化学反応の一つ一つに対してその反応を担う，固有の構造を持った酵素その他の蛋白質が存在すると考えられている。蛋白質が細胞内のあらゆる活動を円滑に進めるための媒体として機能しているのは，分子としての化学的性質は比較的単純ながらもそれから形成されうる高次構造は無限ともいえる多様性を秘めているためではないかと思われる。

生体内において蛋白質が合成される一連の過程は現在ではほぼ明らかにされている。それぞれの蛋白質を規定するアミノ酸配列の情報は塩基配列としてDNAに貯蔵されている。DNAがRNAポリメラーゼによりメッセンジャーRNAに転写され，リボソームとトランスファーRNAにより遺伝情報はポリペプチド鎖に翻訳される。生体情報のこのような流れは生物化学の分野において“Central Dogma” (1)と呼ばれ，生物化学的あるいは分子遺伝学的なあらゆる研究の出発点として認識されている。ところが，蛋白質が合成されて生理的な活性を持つようになるためにはある過程（フォールディング）を経てその配列に特異的な立体構造を形成する必要がある，この立体構造の形成過程に関する理解は“酵素”という言葉が使われはじめて約300年，蛋白質が同定されて200年たった今でも完全ではないのが現状である(2)。

### 1-B. 蛋白質の立体構造の静的側面(3, 4)

Kendrewらが1960年代に鯨のミオグロビンの立体構造をX線結晶解析により明らかにしたのを始め(5)，現在では数千個の蛋白質の立体構造が分子レベルで明らかになっており，これらの構造の情報をもとに現在では蛋白質の高次構造について以下に示す4段階の階層的な分類を用いてその性質を論じるようになっている。

あらゆる蛋白質にはその蛋白質に固有のアミノ酸配列が規定され，このアミノ酸



配列を基礎にして多岐にわたる高次構造が形成されている。各蛋白質のアミノ酸配列は蛋白質の一次構造と呼ばれ、個々の蛋白質を定義するもっとも基本的な情報である。細胞内の様々な遺伝子の機能や発現機構を解析することを目的とする分子遺伝学分野では遺伝子配列より推定された蛋白質の一次構造を比較し、似通ったアミノ酸配列を持った蛋白質同士の共通の構造的特性や生理的活性を考察することが一般的になっており、高次構造の情報を内在するという蛋白質の一次構造の本質的な特徴をよく反映している（図1）(6)。

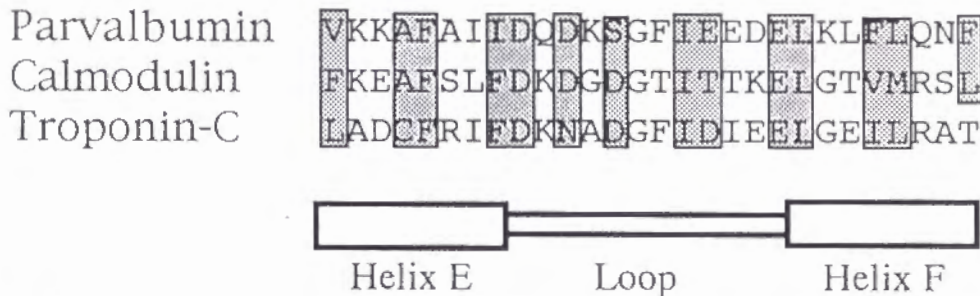


図1. 三種類のカルシウム結合蛋白質, Parvalbumin, Calmodulin, そしてTroponin-Cのそれぞれのカルシウム結合部位に当たるアミノ酸配列の比較（文献(6)より抜粋）。これら3種のカルシウム結合蛋白質は“EF Hand”と呼ばれる共通の立体構造を介してカルシウムを結合することが知られている。配列の下に示した模式図はEF Hand構造のE-Helix, F-Helix, そしてそのあいだを連結するLoop構造に相当するアミノ酸配列の領域を示した。網掛けされている残基は結合部位の形成, ならびにカルシウムの結合に直接関与していることが知られている残基である。

数多くの蛋白質の立体構造を観察すると、ポリペプチド鎖の主鎖の構造はごく短い領域において規則正しい構造単位が形成されており、主鎖の全体構造はこれらの構造単位の複合体であることがわかる。このポリペプチド鎖の構造はそのアミノ酸配列には強く依存しない反復構造で、その形成の原動力となっている分子間力はポリペプチド鎖主鎖のカルボキシル基とアミノ基との間の水素結合であることが明らかとなった。このような、比較的短い領域のポリペプチド鎖において形成される規則正しい主鎖の構造を蛋白質の二次構造と呼び、現在では主に4種類のものが知られている（図2）。 $\alpha$ ヘリックス構造はポリペプチド鎖の主鎖が右に螺旋を巻いた構造である。構造の安定性には主に数残基（約4残基）離れたアミノ酸残基同士の主鎖のアミノ基とカルボキシル基が形成する水素結合が寄与する（図2）。これに対し $\beta$ ストランド構造はポリペプチド鎖の主鎖が直線的に伸張した構造で、 $\beta$ ストランド構造を形成したポリペプチド鎖は互いに平行に配向し、ストランド間の主鎖のアミノ基とカルボキシル基が水素結合を形成することで構造を安定化すると考えられている（シート構造；図2）。2本の $\alpha$ ヘリックスを連結するような形でしばしばみられる構造として $\beta$

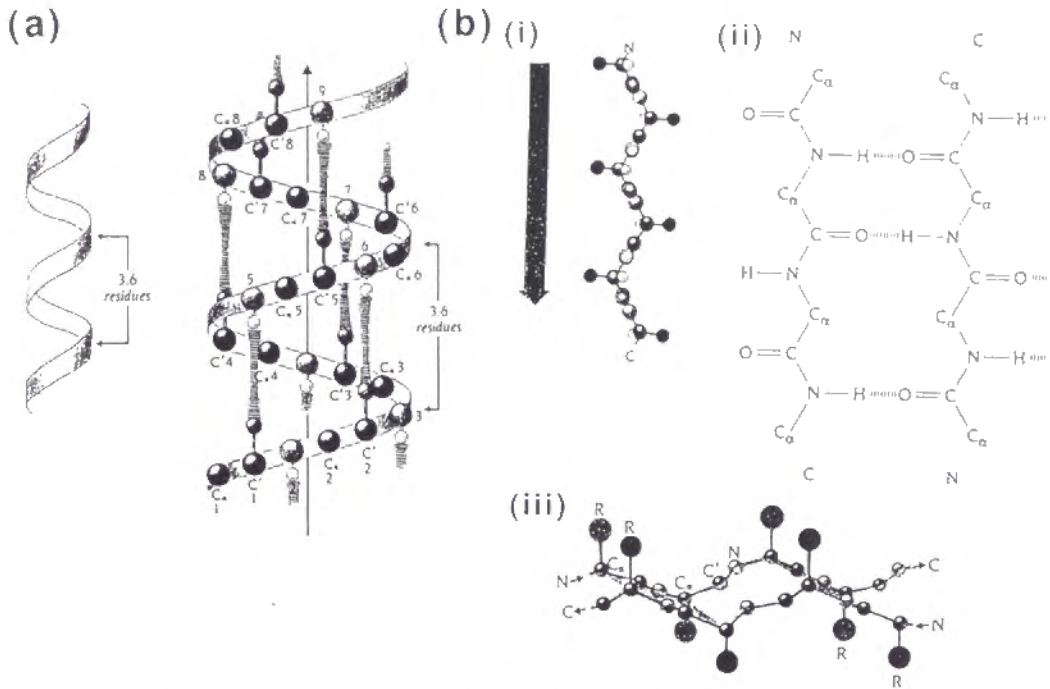


図2. 蛋白質の二次構造(6)。(a)  $\alpha$ ヘリックス構造。螺旋は伸長方向に対し右巻きで、一回転あたりの残基数は3.6残基である。分子模型をみれば、1番目の残基のカルボキシル基を構成する原子が5番目の残基のアミノ基を構成する窒素原子と水素結合を形成していることがわかる。(b)  $\beta$ -構造。 $\beta$ -ストランド構造は図(i)のように直線的にのびきった構造である。このようなストランド構造が複数配置して形成されるのが $\beta$ -シート構造で、隣接したストランド同士で水素結合を形成し、安定化されていることがわかる(ii)。 $\beta$ -シート構造内のポリペプチド鎖は(iii)に示したように側鎖がシートの平面に対し垂直に、交互に突き出している。

ターン構造があり、生体内にみられる20種類のアミノ酸の中でもっとも立体的に拘束された、唯一のイミノ酸であるプロリンはこの構造内に含まれる場合が多い。最後に、酵素などの活性部位近傍にみられる不定形の構造、ループ構造が二次構造の中でもっとも自由度の大きい構造で、酵素の活性発現に大きく寄与している例が報告されている(6)。

ポリペプチド鎖の二次構造が会合して形成する全体構造を一般に三次構造と定義する(図3)。三次構造の安定化に寄与する主要な分子間力はアミノ酸の側鎖の相互作用、即ち電荷を持つアミノ酸残基の静電相互作用、極性アミノ酸残基間の水素結合、そして疎水性アミノ酸残基が会合することにより水分子を排除する性質を表す疎水的相互作用、などである。構造の安定化にアミノ酸側鎖の相互作用が寄与するため、蛋白質の三次構造の定義の中にはアミノ酸側鎖の配向性も規定される。蛋白質の三次構造がアミノ酸配列に強く依存するのもその安定化に側鎖の相互作用が重要な位置を占めているためであると考えられる。また、様々な蛋白質のX線結晶解析により得られた三次構造を観察すると、分子量の大きな一本のポリペプチド鎖はしばしば数



個の独立した構造単位が会合したような構造を形成する。同じポリペプチド鎖上で形成されるこのような三次構造の単位をドメイン構造と呼び、ドメインが会合して形成される最終的な三次構造と区別されて論じられる場合もある。

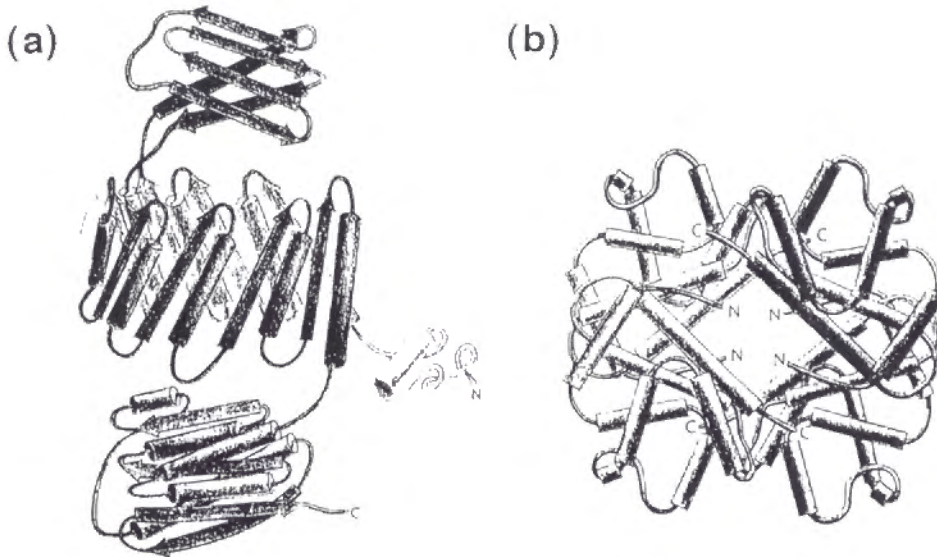


図3. 蛋白質の三次構造と四次構造(6)。(a)は、ピルビン酸キナーゼと呼ばれるリン酸化酵素の三次構造を、ドメインを分離してよくわかるようにした図である。ピルビン酸キナーゼは大きく3つのドメインがポリペプチド鎖上で形成され、これが会合することにより実際の立体構造が形成される。図中の円柱は $\alpha$ -ヘリックス、矢印は $\beta$ -ストランド構造を指す。(b)蛋白質の四次構造の概念図。三次構造と最も顕著な違いは、この構造が複数(図中では4本)のポリペプチド鎖により構成されている点である。

生体内において、ポリペプチド鎖が単独に存在して生理的活性を発現している場合もあるが、生体内ではより複雑な生理的活性の発現、及びその活性を正確に調節するために複数のポリペプチド鎖が非共有結合的に会合して規則正しい構造を形成する場合が大多数をしめる。蛋白質の四次構造とはこのような、複数のポリペプチド鎖が非共有結合的に会合して形成する構造を指す。蛋白質の四次構造は広い範囲にわたって各々のポリペプチド鎖の構成アミノ酸残基が互いに相互作用することにより安定化され、その安定化に寄与するもっとも大きい因子は疎水性アミノ酸残基に由来する疎水性相互作用である。

上記の蛋白質の立体構造に関する静的な情報、即ち生理的活性を持つ構造に関する情報はX線結晶解析法やNMR法など、近年開発された様々な実験法により解明されるようになっており、個々の蛋白質に関する具体的な情報は年々加速度的に蓄積されている。一方、このような複雑な高次構造が実際に形成される動的過程(蛋白質フォールディング)に関する研究もここ数十年に急速に進歩しており、現在では蛋白質



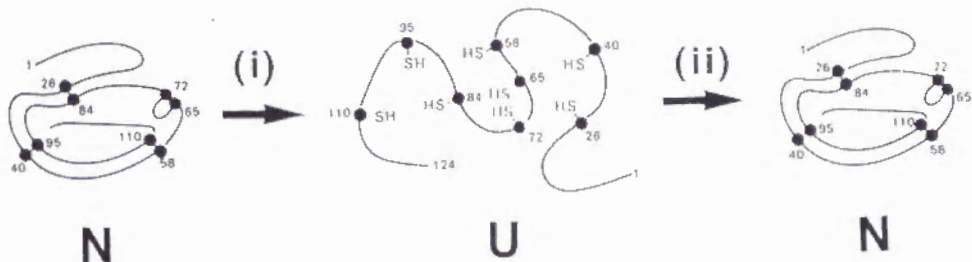
の構造形成反応をある程度理論的に解釈できるようにもなっている。現在での蛋白質のフォールディング過程に対する理論的取り扱いを、歴史上重要と思われる研究例とともに以下において概観する。

## 1 - C. 蛋白質の立体構造の動的側面 - 蛋白質フォールディング(3, 7-9)

### 1 - C - 1. 熱力学的考察

1956年にC. AnfinsenがリボヌクレアーゼAという、124残基のアミノ酸からなるモノマー（単量体）酵素の構造形成に関する系統的研究を初めて行った(10)（図4）。

(a)



(b)

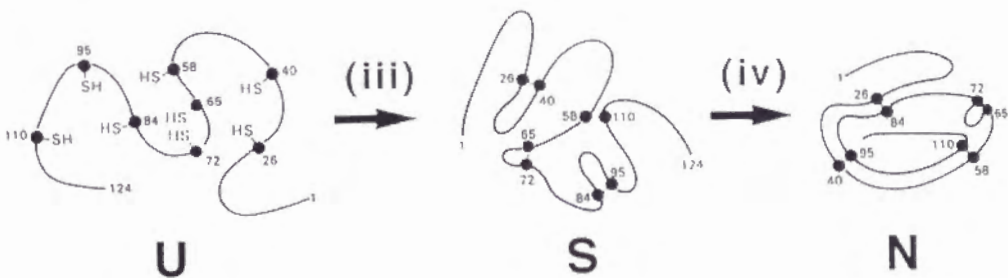


図4. Anfinsenの行ったリボヌクレアーゼAに対するフォールディング実験（図案及び実験の要旨は文献(182)より引用）。図中のNはネイティブ構造，Uは尿素中でジスルフィド結合を還元したいわゆる完全変性型のリボヌクレアーゼA，SはU状態に尿素中でジスルフィド結合を形成させて得るスクランブル型のリボヌクレアーゼAである。それぞれの実験手順は(i)～(iv)で示した。実験(a)では，N状態のリボヌクレアーゼAを8 M尿素中で変性させ，2-メルカプトエタノールで還元する(i)。続いて，透析により，尿素を取り除き，透析試料を空気中にふれさせておくことによりジスルフィド結合の酸化を行わせる(ii)とN状態がほぼ定量的に得られた。実験(b)では，U状態のリボヌクレアーゼAを尿素中で酸化状態にすると(ii)，活性がネイティブ状態の約1%に相当するS状態が形成される。1%の活性は，変性状態で自由に形成されうるジスルフィド結合の組み合わせの総数（105通り）のなかの一つがネイティブ状態であるために現れる。このS状態に微量の2-メルカプトエタノールを加えると(iv)リボヌクレアーゼAはジスルフィド結合の組み替えを行うことができ，そのような状態で自然に形成される構造がN状態である。

リボヌクレアーゼAは分子内に4本のジスルフィド結合を有しており，Anfinsenは4 M尿素存在下で2-メルカプトエタノールを添加することによりリボヌクレアーゼの立

体構造を完全に失わせた（変性させた）後、透析により変性剤を取り除き構造が形成される様子（再生する様子）を観察した。その結果、変性リボヌクレアーゼ A は単純に透析するのみで活性のある高次構造を 100% 再生した。つぎに Anfinsen は 4 M 尿素存在下で 2-メルカプトエタノールを取り除き、変性した状態でジスルフィド結合を一旦形成させた後に透析により尿素を取り除くと、活性の回復は 1% 未満であった。これは、自由度の高い変性状態でジスルフィド結合が無作為に形成されたため、大部分のリボヌクレアーゼ分子は不活性な構造にトラップされたためであると考えられた。ところが、この失活したリボヌクレアーゼ A に微量の 2-メルカプトエタノールを添加すると、不思議なことに活性が完全に回復した。この一連の実験事実より Anfinsen は 2 つの重要な原理を導き出し、この 2 つの原理は現在、蛋白質のフォールディングに関する研究を行う上でもきわめて大切なものとなっている。第一に、透析により変性剤を取り除いたのみで（外界からの手助けをいっさい受けず）構造を持たないリボヌクレアーゼが自発的に構造を形成する事ができたという実験結果より、蛋白質の高次構造形成に必要なすべての情報はその蛋白質のアミノ酸配列に含まれているという原理が導き出された。そして第二に、変性剤存在下で形成した不活性型のリボヌクレアーゼ A（ジスルフィド結合が無作為に形成された（スクランブルされた）リボヌクレアーゼ A）が、微量の 2-メルカプトエタノール存在下で活性を取り戻すことができたことは、2-メルカプトエタノールの影響でジスルフィド結合の交換、即ち組み替えが可能になり、リボヌクレアーゼ A の分子がその状況で自然に活性を持つ構造、ネイティブ構造に移行したことを意味する。つまり、蛋白質の活性な立体構造はその蛋白質が形成する熱力学的にもっとも安定な構造（の一つ）であるという原理が導かれる。

現在では蛋白質の高次構造の安定性に関し、その熱力学的性質をもとに以下のように解析している(11)。一般に蛋白質は、活性を持つネイティブ（Native）状態と構造を失った変性（Denatured）状態との間の平衡状態において存在するとされている。生理的条件下ではこの平衡は大きくネイティブ状態に偏っているが、塩酸グアニジン（Gdn-HCl）や尿素、高温、中性以外の pH などの条件下では平衡が変性状態に偏り、蛋白質の巨視的状态は変性状態となる。ネイティブ状態と変性状態は従って上記のような因子の濃度、もしくは度合いに依存し、またこの依存性は比例関係などの直線的なものではなく、ある段階を越えると急激に起きる協同的な遷移である（図 5）。

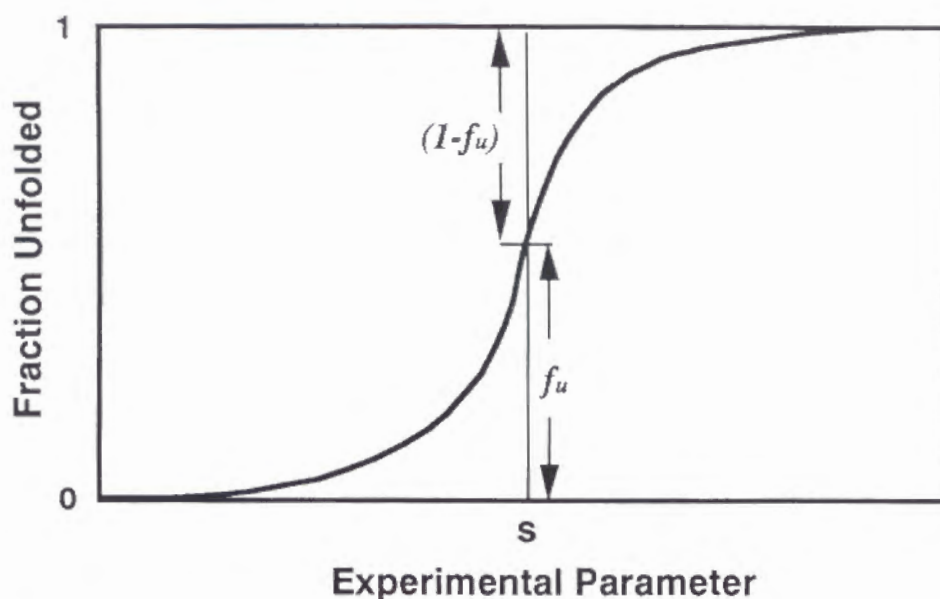


図5. 蛋白質の変性反応に関する遷移曲線。図の横軸は熱、酸、化学変性剤など、蛋白質の高次構造を不安定化する効果を持つ因子で、右側に進むほど蛋白質の変性する傾向が強い（本文中では変性剤濃度、 $s$ が例に挙げられている）。縦軸は溶液中の蛋白質分子のうち、変性している分子の割合を規格化した数値で表したものである。変性剤濃度  $s$  の状態で変性している分子の割合 ( $f_u$ ) を実験的に求めることができれば、その変性剤濃度における蛋白質の変性を伴う自由エネルギー変化を算出することができる。

図中の遷移曲線の中で、平衡が急激に変化している領域（Transition Zone）においては、それぞれの条件（*e.g.* 各変性剤濃度； $s$ ）における  $N \rightarrow U$  反応の平衡定数  $K_s$  は変性している分子の割合 ( $f_u$ ) を利用して以下のように求められる。

$$K_s = \frac{f_u}{(1-f_u)}$$

この平衡定数を利用すれば、各変性剤濃度でのこの蛋白質の変性の自由エネルギー変化  $\Delta G_s$  を求めることができる。

$$\Delta G_s = RT \ln K_s$$

（ $R$  は気体定数、 $T$  は絶対温度）

平衡定数が急激に変化している遷移領域では  $\Delta G_s$  は変性剤濃度と一次関数の関係にあると近似することができ（Schellmanの近似(12)），この関係より水中即ち  $s = 0$  での蛋白質の変性自由エネルギー変化  $\Delta G_{H_2O}$  が外挿法により求められる。

$$\Delta G_s = \Delta G_{H_2O} - m[\text{Denaturant}]$$

このようにして求められる蛋白質の水中における構造安定化の自由エネルギーは一般的に約-5 から -20 kcal/mol 程度と計算されており(3)，蛋白質のネイティブ状態は変性状態よりほんのわずかしかな安定ではない（分子内の1カ所の水素結合に由来する安



定化自由エネルギーはおよそ-3から-5 kcal/mol である(3)) ことがわかる。一般に蛋白質の高次構造内では複数の水素結合やイオン相互作用が形成されるために自由エネルギー変化に寄与するエンタルピー変化 $\Delta H$ は構造形成に伴い大きな負の値を持つ。それに関わらず $\Delta G$ の値がこのように小さいのは構造形成に伴いポリペプチド鎖の自由度が大幅に拘束され、エントロピー変化 $\Delta S$ も大きく負に偏るためであると考えられる。

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

の関係式より、蛋白質の構造安定化自由エネルギーは、相反する二つの大きな項の差であることが理解される。即ち、ポリペプチド鎖の立体的自由度の拘束は複数の水素結合やその他の相互作用に由来する安定化エネルギーによって成し遂げられているといえる。

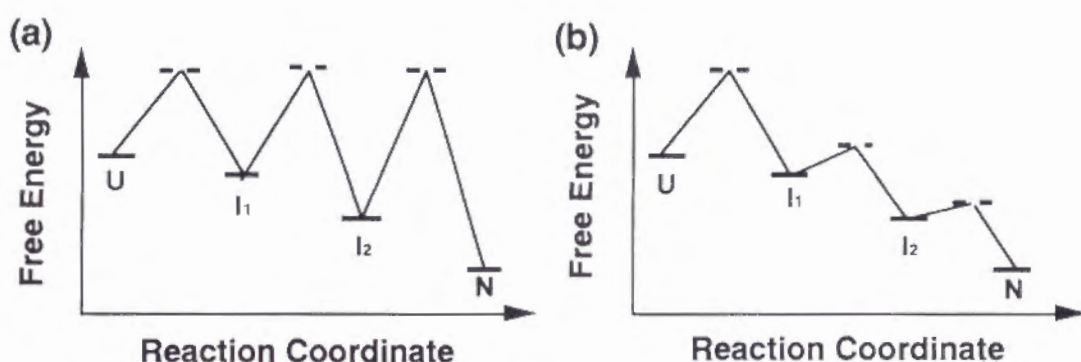


図6. 典型的な蛋白質の構造形成反応中のエネルギー変化を表した模式図。蛋白質の構造形成反応においてはU状態とN状態の間には図に示したような複数のエネルギーの山と谷があると考えられている。それぞれの谷はポリペプチド鎖が安定に存在しうる状態、それぞれの山は状態の間を遷移するために越えなければならないエネルギー障壁である。通常フォールディング反応を行う場合、反応溶液中の条件は平衡をN状態に偏らせるものであるので蛋白質分子は容易にエネルギー障壁を越え、U状態から構造形成を始める。I<sub>1</sub>状態やI<sub>2</sub>状態を隔離するエネルギー障壁が十分に高い場合(a)、I<sub>1</sub>やI<sub>2</sub>の様な中間状態が平衡論的な測定(図5)で観測することができる。しかし、エネルギー障壁が低い場合(b)、蛋白質はこれら中間状態にとどまらず、一気にN状態に移る。このような場合にはI<sub>1</sub>やI<sub>2</sub>の2個の中間状態は熱力学的な測定では観測されない。しかし、実際にはこれらの中間状態は存在するので、すべての分子はこの中間状態を一時的に形成しており、このような中間状態(Transient Intermediate State)形成の有無は速度論的な測定で検出される。

これまでに報告された研究例の大部分は上記の2状態近似により説明される。更に、この2つの状態の他に、熱力学的に安定な中間状態や、熱力学的には安定ではないがすべての分子がネイティブ状態に移行する際に必ず形成する様な構造中間体(Transient intermediate state)などが存在する場合も多く(図6)、これらの中間状態の情報をもとに蛋白質の構造形成反応を類推する。後者のような中間状態は実験系のパラメータ

を急に変化させた、いわゆる非平衡状態における反応速度論的測定により検出することができる。

## 1-C-2. 速度論的考察(7)

蛋白質の構造形成反応においてネイティブ状態と変性状態の間に中間的な状態が存在するという概念は論理的な必然性より生まれた。つまり、蛋白質の立体構造形成が専ら熱力学的な安定化エネルギーによってのみ規定され、決まった中間状態を経ないで構造形成が可能であるとするならば個々のポリペプチド鎖は任意の領域から構造形成を開始する事ができ、それぞれ異なる動的な過程を経て最終的に安定なネイティブ構造を形成できるような機構が成り立つ。このような機構では、構造形成の際にそのポリペプチド鎖が形成しうるすべての構造がほぼ同じ確率で試行される可能性があり、そのうちごくわずかの構造がいわゆる“ネイティブ”に相当するものなのでポリペプチド鎖はその構造を試行錯誤で求めることになる。しかし、実際に生体内においてこのような構造形成が行われているとすると、100残基のポリペプチド鎖が形成しうる構造の総数は控えめに推定して約 $10^{100}$ 通り、それぞれの構造を試行するのに要する時間を大幅に短縮して $10^{-15}$ 秒とすると構造を形成するまでに要する平均の時間は単純計算で約 $10^{77}$ 年、KarplusとWeaverが行ったより正確な試算でも $10^{50}$ 年と試算され(13)、およそ生命活動が維持される時間単位とは異なるものとなる。従って、蛋白質が実際に構造を形成する際にはこれらすべての構造を試行しているとは到底考えられなかった。そこで、すべての分子が必ず形成する中間状態を経て段階的にフォールディングが進行すると考えれば、蛋白質のフォールディング反応は大幅に簡略化される。この仮説を証明するために、その後様々な研究者が蛋白質のフォールディングに関する研究を行い、その結果蛋白質の構造形成はやはり実験で確認可能な中間状態を経て段階的に行われていることがわかった。数多くの研究の中でも、Anfinsenが蛋白質の構造安定性の熱力学的本質を解明するために利用したリボヌクレアーゼAは速度論的にも非常に興味深い性質を示し、後々の蛋白質フォールディングに関する研究にも大きな影響を与えた。

リボヌクレアーゼAは、47℃において、溶液のpHが5付近から2に低下すると構造を失い、変性状態になる（この状態では、ジスルフィド結合は形成されたままである）(14)。しかも、この構造転移は可逆なものであったため、蛋白質のフォールディングを研究するにあたり非常に便利な実験系であった。そこで、GarelとBaldwinは

47℃におけるこの蛋白質のpHによる構造転移を平衡論的、ならびに速度論的に解析した結果、興味深いことにリボヌクレアーゼAの平衡論的解析においては二状態（NとU）の遷移曲線が得られたが、非平衡状態においてフォールディングの反応速度を観察したところ、速度定数の早い反応と遅い反応の2種類の反応が同時に検出された(14)。この、一見矛盾するような実験結果は下の式のようにネイティブ状態と変性状態のほかに変性状態とはエネルギー的に区別することのできない（変性平衡の解析では検出できない）もう一つの変性状態が存在し、一方の変性状態からは素早く、もう一方の変性状態からは非常に遅く構造が形成されると考えれば矛盾なく説明できた。



1975年にBrandtsらはリボヌクレアーゼAのフォールディング反応を様々なモデル反応の速度と照らし合わせ、その結果、リボヌクレアーゼAのフォールディングの遅い反応はポリペプチド鎖内のプロリン残基の異性化から生じるという説を提唱した(15)。リボヌクレアーゼAは分子内に4個のプロリン残基を持つ。プロリン残基は他のアミノ酸残基と異なり側鎖が主鎖のアミノ基と結合しているため立体的に極端に拘束されており、その結果蛋白質分子内におけるプロリンの配向はシス状態とトランス状態の2種類からなると考えられている（図7）。

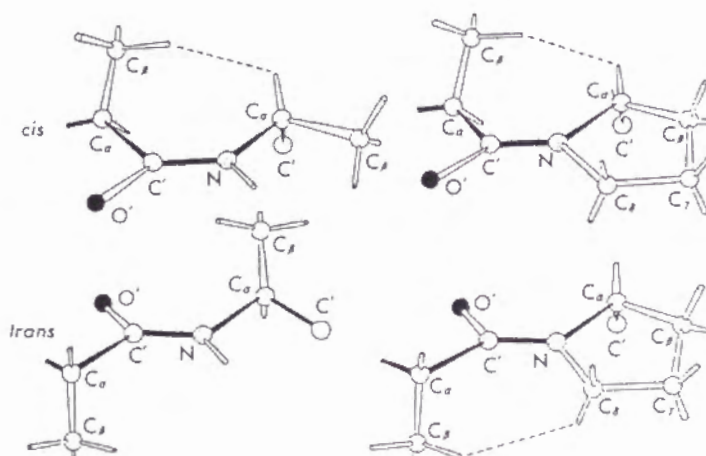


図7. 二種類のジペプチド、Ala-AlaおよびAla-Proのペプチド結合を基準にしたシス型構造とトランス型構造の比較。4種の構造のうち、左側がAla-Ala、右側がAla-Proであり、上に示したのがシス体、下がトランス体である。図中の点線はアミノ酸残基の側鎖の間の立体障害の有無を示す。Ala-Alaにおいてはトランス体は立体障害がない分安定であるが、Ala-Proは両方の異性体で立体障害が生じており、エネルギー的にはほとんど変わらない（文献(3)より引用）。



このプロリンの異性化反応はモデルペプチドで解析すると半減期約75秒から300秒という非常にゆっくりとした反応で(15), 平衡定数は約0.1~1.0でトランス側に平衡が偏っているため(3), 蛋白質分子が変性した場合にみられるようなランダムな状態ではシス体は次第にトランス体に移行すると考えられる(15)。Brandtsらはこのプロリンの異性化反応の熱力学的及び速度論的性質をリボヌクレアーゼAの構造形成中にみられる遅い反応と比較した結果, リボヌクレアーゼAにおいても分子内にシス状態で存在したプロリン残基が蛋白質の変性に伴いゆっくりとより安定なトランス状態に移行して形成されると提唱した。トランス状態に移行したプロリン残基を持つ変性状態が変性剤の希釈に伴いネイティブ構造に回復する際, このトランス状態をシス状態に変えなければいけないために, 余分な, しかも速度の異なる反応が検出されるのである。このプロリンのシス→トランス異性化に由来するフォールディングの中間状態はその後他の蛋白質についても観測され, 具体的な実験によっても検証されている(7)。

蛋白質フォールディングの速度論的研究は, 前述のようにネイティブ状態や変性状態とのエネルギーの差が小さいために熱力学的に検出できないような中間状態でも検出することができるのがもっとも大きな特徴である。蛋白質のフォールディングの速度を測定する具体的な実験方法としては分光学的な特性を測定するもの(アミノ酸配列内の芳香族アミノ酸残基の蛍光スペクトル変化や分子の不斉性を観測する円偏光二色性(CD)スペクトルなど;(16))や分子表面に露出しているアミノ酸残基を特異的に検出する方法(NMR法で解析する重水素置換の実験)などが数多く存在する。中でも, ポリペプチド鎖の構造形成を直接観測するのに有効なNMR法を用いた研究により, ポリペプチド鎖の中間状態において溶媒中に露出している残基と分子内部にあり溶媒と接していない残基の区別をすることが現在では可能になり(17), リボヌクレアーゼAに関してもNMR法を含めた数多くの実験法を用いて現在では4種類以上の速度論的中間状態が検出されている(18)。このように, 比較的分子量の小さい蛋白質についてもその高次構造形成過程は意外に複雑なようである。

### 1-C-3. 蛋白質の高次構造形成に関するモデル(9)

現在では, ランダムな構造のポリペプチド鎖が高次構造を形成する場合, どのような過程を経て高次構造が形成されてゆくかを解明する研究が様々な蛋白質を用いて行われ, その実験結果を総合すると蛋白質は $10^{-3}$ 秒から $10^2$ 秒の時間範囲で以下のような一連の過程を経て構造を形成していくとされている。



桑島らは1988年に自作のストップフロー分光光度計を用いて18ミリ秒以上のごく早いフォールディング反応の解析をチトクロムcと $\beta$ -ラクトグロブリンについて行った(19)。彼らは実験の測定限界以下の時間単位(18ミリ秒以下)においてこれらの2種の蛋白質の二次構造が急激に形成されることをCDスペクトル測定により明らかにした。その後鯉のParvalbuminについても同様の測定を行い(20)、このフォールディング反応初期における急激な二次構造形成の一般性を確認した。他の研究者も鶏リゾチーム(21)やトリプトファン合成酵素 $\beta_2$ サブユニット(22, 23)、リボヌクレアーゼT1(24)についても同様の二次構造形成の初期増加(Burst Phase)を確認することができ、この特徴が一般性を帯びるようになった。また、CDスペクトル測定の他にNMRを用いた重水素置換の実験によってもチトクロムc(25)やT4リゾチーム(26)についてフォールディング反応開始後約2ミリ秒から8ミリ秒の間にかかなりのアミノ酸残基が溶媒との水素原子交換から保護される、つまり水素原子の交換を許さない水素結合が形成されつつあることが確認された。これら一連の実験結果により、蛋白質はフォールディング反応初期(数ミリ秒以内)において最終的な立体構造の基礎となる二次構造が形成されることが明らかとなった。この初期反応において形成される二次構造の割合は蛋白質の種類により最終的な高次構造の二次構造含有量に比べて30%と少ないものから170%という非常に多いものまで報告されている(27)。

二次構造形成と同時にあるいは少し遅れてみられる現象の一つとして疎水性領域の形成が挙げられる。これは疎水性領域に結合すると量子収率が増大する(蛍光の強度が増加する)1-anilinonaphtalene-8-sulfonate(ANS)などの蛍光色素を用いた研究より明らかとなった。M. Goldbergらはトリプトファン合成酵素の $\beta_2$ サブユニットを限定分解することにより得たポリペプチド鎖の断片を用いて、フォールディング反応初期における二次構造の形成とほぼ同じ時間単位でANSの蛍光強度が増加することを確認する事に成功し(23)、この結果より二次構造形成に伴い疎水性残基の会合が生じ、ポリペプチド鎖が凝集したような中間状態が形成されていることが示唆された。更に、この中間状態は三次構造が形成される際に観測される波長領域250 nmから300 nmにおけるCDスペクトルの吸収が観測されない(19, 22, 28)、三次構造といえるような二次構造成分の規則的な配向は存在しないと考えられる。このようにポリペプチド鎖が比較的流動的に(決まった三次構造を持たずに)二次構造成分が会合し、疎水性領域を形成する現象をHydrophobic Collapse(疎水的凝集)とよび、Hydrophobic Collapseにより形成されるこの中間状態は1981年にPtitsynらが提唱した蛋白質のモルテングロビ

ュール状態の性質を数多く保有している(29)。

モルテングロビュール状態とは1976年において初めて観測された蛋白質の構造中間状態である。この年に桑島らは $\alpha$ -ラクトアルブミンのフォールディングの研究を行った際、 $\alpha$ -ラクトアルブミンは低pH条件下で二次構造の指標となる遠紫外領域のCDスペクトルはネイティブ状態とほぼ同一のものであるにも関わらず、三次構造形成の指標となる近紫外領域のCDスペクトルが全く観測されない中間状態を形成することを解明した(30, 31)。1981年にPtitsynらはこの中間状態をネイティブ状態と変性状態の両方の性質を兼ね備えた Compact Globule with Fluctuating Tertiary Structure (流動的な三次構造を持つコンパクトな球状状態)と名付け(29)、その後1983年に大串と和田らはチトクロムcについて同様の状態を観測し、正式にモルテングロビュール状態(モルテン; 金属などが高温で溶液上になったような、グロビュール; 球状)と名付けた(32)。“モルテングロビュール”という言葉自身はPtitsynが学会中の討論で初めて用いたとされている(32)。その後の研究によりモルテングロビュール状態は数多くの蛋白質が形成しうる構造状態の一つであり、特に高塩濃度下、酸性状態で蛋白質の三次構造が失われ、ポリペプチド鎖上の電荷が塩により遮蔽された状態になると形成されやすいことが解明された(33, 34)。前述した蛋白質の一般的な構造形成過程においてもHydrophobic Collapseを経て形成される状態はこのモルテングロビュール状態の性質を数多く持っているとしており、そういう意味で蛋白質のフォールディングにおいてもかなり重要な構造の一つではないかと考えられている。

フォールディング反応開始5ミリ秒後から約1秒の間にフォールディングの次の段階、即ち三次構造成分の形成がみられ始める。この段階における反応速度は前述したANSの結合の増加やネイティブ状態に類似したCDスペクトルの出現、そしてネイティブ状態においてみられる構造的成分を認識する抗体の特異的な結合などにより測定される。Goldbergらはトリプトファン合成酵素の $\beta_2$ サブユニットのフォールディング反応において、初期の二次構造形成がCDスペクトル測定より観測された後、最終的な高次構造が確認される前にANSの結合、続いて高次構造を特異的に認識する抗体の結合などを確認することができ、二次構造形成から最終的な高次構造が形成されるまでにその中間段階に当たる構造形成の過程が存在することが明らかとなった(22)。このほかにもSemisotnovらは $\alpha$ -ラクトグロブリンと炭酸脱水酵素のフォールディング反応において(35)、またMatthewsのグループはジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)(36)において同様の過程を見いだしている。この段階のフォールディング反応においては



ANSの結合量の増加、特定の三次構造成分を認識する抗体の結合などにより、三次構造形成の指標が観測されるのだが、完全なネイティブ状態形成を示唆するような基質結合能力がみられないので、最終的なネイティブ構造の形成段階とは区別されている。まとめると、フォールディングの第二段階においては最終的なネイティブ構造を形成する段階に先立つ中間状態の形成反応であるといえる。

蛋白質の立体構造を形成する次の段階は、最終的な三次構造の形成反応である。第三段階であるこの過程においては蛋白質分子内部の疎水的コア（中核）の形成、アミノ酸側鎖の間に形成される水素結合網の形成、そして二次構造成分の最終的な配向の決定が行われる。この第三段階の過程は一般的に1秒から数百秒の時間単位において起きると考えられており、比較的实验で取り扱いやすい過程であるので、これまで数多くの研究が報告されている。この段階の反応を検出する手法は分光学的手法を始め数多く存在し、特に興味深いものとしては基質など、蛋白質に特異的に結合する様々なリガンドの結合能力を測定する方法、そして分光学的にとらえたフォールディング反応をより詳細に解析するためにポリペプチド鎖の特定のアミノ酸残基を置換してフォールディング反応がどの様に変化するかを調べる部位特異的変異法を用いた実験手法などが挙げられる。前者の研究の好例としては桑島らの行った $\alpha$ -ラクトアルブミンに関する研究が存在する(37)。彼らは $\alpha$ -ラクトアルブミンがネイティブ状態においてカルシウムイオンが結合する性質を利用し、フォールディング反応の各段階における中間状態のカルシウム結合能を測定した。その結果、 $\alpha$ -ラクトアルブミンは第一段階後に形成されるモルテングロビュール様の構造を形成している場合非常に弱くカルシウムを結合し( $K = 10^3 \text{ M}^{-1}$ )、第二段階後の中間状態にはやや強く( $K = 10^5 \text{ M}^{-1}$ )、そしてネイティブ状態にもっとも強く結合することを明らかにした( $K = 10^6$  から  $10^7 \text{ M}^{-1}$ )。一方、Parvalbuminに関しては二つ存在するカルシウム結合部位に関して一つの部位は $\alpha$ -ラクトアルブミンと同様な振る舞いを見せるがもう一方の部位に関しては第二段階の中間体が形成されるとともに結合能が現れること(20)、また *Staphylococcus* 由来のヌクレアーゼに関してはカルシウム結合能はネイティブ構造が形成されるまで現れないことが解明されており(27)、蛋白質によりリガンドの結合部位が形成される時期も多岐にわたることを解明した。後者の研究例としてもっとも代表的であるといえるのはFershtの研究室で行われた *Bacillus amyloliquefaciens* 由来のリボヌクレアーゼ（バーナーゼ）に関する一連の変異体に関する研究であろう(38-40)。彼らはこのバーナーゼのフォールディング反応においてネイティブ構造が形成される直前に

みられる構造中間体の安定性に注目し、分子内の各部位に存在するアミノ酸残基に一つずつ変異を加え、この中間状態の安定性がどのように変化するかを測定した。その結果、中間状態においてすでに形成されているネイティブ様の構造部位を特定することに成功し、バーナーゼのフォールディング反応における中間体の構造的性質をかなり正確に把握することができた。

以上、3段階からなる蛋白質の一般的なフォールディング反応を以下の図にまとめた(図8(9))。

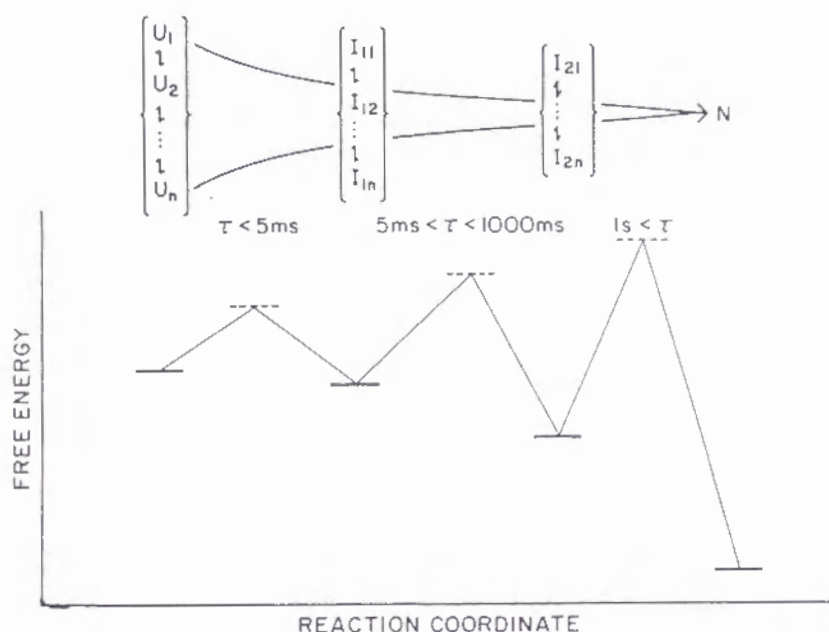


図8. 一般的な蛋白質のフォールディング反応を表す模式図。図の上部には蛋白質が形成する様々な構造の移り変わりを示し、下部はそれぞれの状態を規定するエネルギー準位の一例である。1-C-3. で要約したとおり、構造を形成する蛋白質分子は段階的により高次の構造を形成していくが、構造が高次になればなるほど形成に要する時間が長くなる。エネルギー的に規定された状態には複数の構造が存在しうるので、実験的に観測しているいわゆる中間状態とは実際には無数の微視的状态からなる集合である。構造形成の段階を経るにつれ、各状態を構成する微視的状态の総数が減少し、最終的なネイティブ構造が形成されると思われる(文献(9)より引用)。

第一段階においては急速な二次構造形成ならびに疎水的相互作用による分子の凝集によりモルテングロビュールと呼ばれる中間状態を形成し、次に三次構造形成に必要な相互作用の出現に伴う中間状態形成、そして最終的な三次構造形成へと一連の過程を踏んで高次構造は形成される。それぞれの段階を経て生成される状態は構造的に単一であることは考えにくく、むしろエネルギー的に似通った安定性及び構造的性質を持った分子の集合であると考えたほうが妥当である。これらの各段階により形成される中間状態は実験的に検出可能であるので、フォールディング反応途中に分子が一時的に蓄積されるようなエネルギーの谷が存在すると考えることができる。段階を進むに



つれ、集合を構成する分子種の数が増加し、最終的にネイティブ状態と呼ばれる限定された構造が形成されると考えられる。

#### 1-C-4. 蛋白質の四次構造形成の位置付け—フォールディングとアソシエーション (Association) の関係 (41)

上記の一連の過程においてはオリゴマー蛋白質のフォールディングに関するきわめて重要な段階、即ちサブユニットの会合により形成される四次構造形成の段階が全く考慮されていない。蛋白質のサブユニット会合はフォールディングと分離されて考えられている傾向が強く、オリゴマー蛋白質の構造形成の最後の段階と考えられるこのサブユニット会合はフォールディングとは呼ばれず、アソシエーション (会合) と呼ばれ、いささか別個の扱いを受ける。オリゴマー蛋白質のフォールディングに関する研究は対象となる蛋白質の分子量が一般的に大きいため、これまでに紹介してきた分子量の比較的小さいポリペプチド鎖に関する定量的な研究と比較してやや遅れているといわざるを得ない。従って、オリゴマー蛋白質形成の最終段階に関する情報も、他のフォールディングの段階に比べて少ないことも事実である。しかし、中にはドイツの R. Jaenicke らやフランスの M. Goldberg らの様に様々なオリゴマー蛋白質のフォールディングならびにアソシエーションに関する知見を重点的に蓄積してきている研究者もあり、その結果幾つかの統一的な法則が解明されてきた。

オリゴマー蛋白質の四次構造を安定化する主要な要因は会合のため溶媒から保護される疎水性部位に由来するエネルギーであると考えられている。Chothia は理論的計算を用いてサブユニット会合により溶媒から保護される分子の表面積を約  $1000 \text{ \AA}^2$  から  $5000 \text{ \AA}^2$  と計算しており (42)、ポリペプチド鎖の広範囲にわたる複数の疎水性アミノ酸残基が会合して疎水性部位を形成し、サブユニット間でこの疎水性部位が会合して四次構造形成に必要な安定化エネルギーが得られている。

オリゴマー蛋白質の四次構造形成はフォールディングの第三段階とほぼ同じか少し遅い時間単位で形成される場合が多いので、一般的に実験によって検出する事が容易である (41)。また、他の 3 つの段階にはない、多分子反応であるという性質は反応速度論的にも確認することができる。すなわち、サブユニットが会合するような反応は最低でも二分子反応であるため、見た目の速度は基質、即ち会合すべきポリペプチド鎖の濃度に依存するはずである (41)。様々な蛋白質濃度におけるフォールディングの反応速度を分析すれば、どの反応において四次構造の形成が行われているのか、また会

合の手順はどのようなものであるのかに関する情報が得られる。オリゴマー酵素の四次構造形成反応はまた、実際の会合過程を分子間架橋試薬などで直接検出する方法や高圧によりサブユニットの解離を促し、常圧で四次構造形成のみを測定することも可能である(43)。

# 1-D. *In vitro* フォールディングの研究と *in vivo* フォールディングの研究, その類似点及び相違点(41)

フォールディングの研究を実際に行う場合、研究者は標的となる蛋白質を細胞内より精製し、厳密な研究室環境において実験を行うのが普通である。蛋白質のフォールディング反応を観測する一般的な条件は、液性は中性付近、温度は生理的温度即ち20℃から37℃で、標的の蛋白質の濃度は実験手段に応じて0.01  $\mu$ g/mlから10 mg/ml程度に定めるのが通常である。そして当然のことながら、フォールディングの反応に使用される蛋白質の試料はアミノ酸配列の完成した、いわゆる完全長のポリペプチド鎖を用いるのが一般的となっている。これらの実験室の条件と実際の細胞内においてフォールディングが進行する条件とを対比させると、当然のことながらpHや温度など類似した点も数多いが、幾つかの重要な点において異なっていることも知られている。まず、前述の完全長のポリペプチド鎖を用いて研究を行う点に関しては、現在知られている蛋白質合成の機構を考慮すると実際の細胞内におけるフォールディングを反映していない可能性も示唆されている。細胞内においてはポリペプチド鎖の合成は最高40残基/秒の速さで行われると考えられており(44)、仮に300残基のアミノ酸がリボソームに合成されているとすれば、最後の100残基が合成される2~3秒間のあいだに最初の200残基がある種の高次構造をとる可能性が十分あるといえる。もしこのようにポリペプチド鎖の全長が合成される前にフォールディングが開始されており、形成される構造が蛋白質のフォールディングに重要な中間過程であるならば、完全長のポリペプチド鎖を利用して行っている*in vitro*のフォールディングに関する研究と初期条件が大きく食い違う。

もう一つ、*in vitro*と*in vivo*の間で大きく異なる点がある。細胞質内には一般的に何百種類の蛋白質が同時に存在し、その合計蛋白質濃度は約100~150 mg/mlと試算されている(45)。このような非常に濃度の高い状態を実験室内で再現することはほぼ不可能であり、そもそもオリゴマー蛋白質が構造を形成する際、蛋白質の濃度を高く設定するとアグリゲーションと呼ばれる不可逆的かつ非特異的な分子の会合が生じる。ゆ



で卵などにみられる白身と黄身の凝固などはアグリゲーションの典型的な例であり、蛋白質はこのような状態になると正しい構造を形成することは不可能となる。従って、このアグリゲーションの点において、*in vivo*と*in vitro*のフォールディングの間に決定的な差が存在するといえる。

アグリゲーションを形成する主な原因はオリゴマー酵素が四次構造を形成する際にも重要である疎水性分子間相互作用にあると考えられている。疎水性相互作用は本来水素結合やイオン相互作用のように局所的かつ特異的な相互作用ではなく、広範囲にわたって分子が相互作用する比較的非特異的な相互作用である。蛋白質が構造形成途中に形成する中間状態はしばしば分子表面に疎水性部位を露出させている場合が多く、構造形成中の蛋白質濃度が濃すぎるとこれらの部位が分子間で相互作用し、会合し始める。十分蛋白質濃度が高いと極めて広範囲にわたるアグリゲーションが観測されることになる。特に、疎水性相互作用により会合することによって四次構造を形成するようなオリゴマー蛋白質はこのアグリゲーションにより分子が会合する傾向が強く、オリゴマー酵素のフォールディング反応は一般に可能な限りの低い蛋白質濃度で行う(41)。

このようにして*in vivo*のフォールディングと*in vitro*のフォールディングの相違点を挙げてゆくと、次第に試験管内で観測しているフォールディングははたして実際に細胞内で行われているフォールディングと同じ現象であるのかと疑いすら生じる。また、より抽象的な視点に立てばこれまでに実験室内で観測されたフォールディングの中間体などは実際の細胞内においても重要なものなのか、それとも実験室で観測するフォールディング反応の副産物であるのかという疑問はフォールディングを研究する際に絶えずつきまとうものであった。長い間、研究者はこの疑問を解消することができなかったが、ここ数十年間において幾つかの変わった活性を持つ蛋白質が細胞内の様々な活動に関連して同定されており、細胞内における蛋白質のフォールディングを解明するにあたり、極めて重要な手がかりをもたらしている。以下において、細胞内のフォールディング反応を円滑に進行させる作用を持つこれらの蛋白質をその作用機作、即ち触媒作用(Catalysis)と“補助”作用(Facilitation)に分類して紹介する。

#### 1-E. 蛋白質フォールディングを触媒する蛋白質—PPlase と PDI (46,47)

現在世界中で活発に行われているヒトの臓器移植を行う際、医者は新しく移植された臓器が患者の体により拒絶されないために免疫抑制剤を投与することが一般的に



なっている。近年開発された免疫抑制剤の中でも、シクロスポリンAやFK506に代表される一連の免疫抑制剤は極めて効果が強く、比較的副作用も少ないので多用されている(図9)(48)。

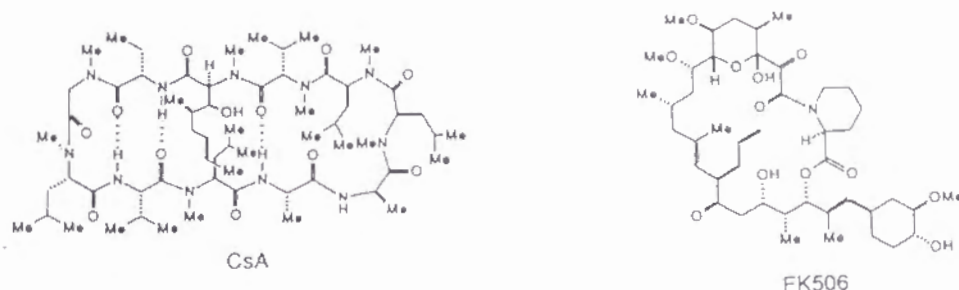


図9. 免疫抑制剤シクロスポリンA (CsA) とFK506の構造式。Me-はメチル基を指す。

この種の免疫抑制剤が作用する標的蛋白質はそれぞれシクロフィリンとFKBP (FK506 Binding Protein) などという名で知られており、総称してイムノフィリンと呼ばれる。最近の研究でこれらイムノフィリンは生物全般で広くみられるアミノ酸配列内のX-Pro (Xは任意のアミノ酸残基) のC-N結合の回転、いわゆるプロリン残基のシス・トランス異性化反応を加速するペプチジル・プロリルシス/トランスイソメラーゼ (Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerase; PPIase) と同一のものであることが明らかとなった(49,50)。また、シクロスポリンAとFK506はこれらのプロリルイソメラーゼの阻害剤として作用することが明らかとなった。つまり、本序論前半で述べた、プロリンに由来するリボヌクレアーゼAのフォールディングの中間状態にこれらイムノフィリンが影響を及ぼす場合が考えられ、実際、リボヌクレアーゼT1におけるプロリンに由来する遅いフォールディング反応は100倍以上加速されることが報告されている(50)。しかし、注意しなければならないのはこの効果は構造を形成する蛋白質の種類に強く依存するということであり、たとえばリボヌクレアーゼAの遅い反応にはPPIaseは効果を示さない(51)。

PPIaseの仲間に分類される蛋白質は多様であり、例として分子量の分布を上げると分子量約1万2千のヒトFKBP (52) からヒトのJurkat細胞株から単離された分子量約8万のリン酸化された蛋白質 (53) まで存在する。共通の性質としてはシクロスポリンAやFK506などで代表される環状ポリペプチド鎖の免疫抑制剤に対し高い親和性を持つことである。これらイムノフィリンの正確な細胞内機能は現時点では明らかにはなっていない。

いないものの、イムノフィリンの仲間であるショウジョウバエの*ninaA*蛋白質はロドプシンの機能発現に重要であること(54, 55)、また、鶏の繊維芽細胞にシクロスポリンAを作用させるとコラーゲンのフォールディングに影響を与えることなどが知られており(56)、細胞内においてイムノフィリンが特定の蛋白質のフォールディングを“触媒”していることも示唆されている。

リボヌクレアーゼAはまた、正しくジスルフィド結合が形成されなければ活性が発現されなかったが、細胞内にはこのジスルフィド結合形成を促進するような蛋白質も存在する。Protein Disulfide Isomerase (PDI) と呼ばれるこの蛋白質(57)は厳密には新規のジスルフィド結合を形成する能力を持つわけではなく、むしろ既成のジスルフィド結合の交換反応を触媒する事により誤って形成されたジスルフィド結合(Anfinsenの実験で形成されたような誤ったジスルフィド結合を形成したリボヌクレアーゼAなど)の速やかな“かけ直し”を可能にする活性を持つ。事実、誤ったジスルフィド結合を持ったリボヌクレアーゼAにPDIを作用させると自発的にみられる速度の約20倍の速度で活性を持ったリボヌクレアーゼが回復することが報告されている(58, 59)。分子量約5万7千の2量体蛋白質であるPDIは分子内に2カ所の活性部位を持ち、この2カ所の活性部位を用いて他の蛋白質のジスルフィド交換反応を触媒すると考えられている(60)。

以上のようにPPIaseやPDIはこれまで蛋白質のフォールディングの研究において重要とされる中間状態に特異的に作用し、蛋白質のフォールディングを円滑に進行させる効果を発現することが示唆されている。この事実は、間接的ながらも細胞内のフォールディングと試験管内のフォールディングに共通の特徴が見いだされ、細胞内ではより円滑にフォールディングを進行させるような特殊な蛋白質が存在するという興味深い事実を反映しているように思える。

#### 1-F. 蛋白質フォールディングを補助する蛋白質—熱ショック蛋白質とモレキュラーシャペロン

1974年にTissieresらはショウジョウバエの幼虫を最適生育温度(25℃)よりも高い温度で飼育するとある限られた一群の蛋白質が細胞内において誘導、または発現増加されることを報告した(61)。彼らはこの誘導される一群の蛋白質をその誘導方式にちなんで熱ショック蛋白質, Heat Shock Protein と名付けた。不思議なことに、その後ショウジョウバエなどの細胞の成長に関する様々な研究において生育上好ましくな



い様々な因子(62) (酸化的リン酸化経路などの代謝経路を遮断する因子や特定の蛋白質の阻害剤など) が存在する中で同じ一群の蛋白質が誘導されていることが明らかとなった。1978年にKelleyとSchlesingerがアミノ酸類似体存在下で培養した鶏の繊維芽細胞において(63), そして1980年にHightowerが抗生物質のピュロマイシン存在下で培養したショウジョウバエの細胞内において(64)同様の誘導効果を観測したことより熱ショック蛋白質の役割に関する重要な手がかりが得られた。アミノ酸の類似体が細胞内に存在する場合, 極端に寿命の短い蛋白質が合成されること, ならびにピュロマイシン存在下では合成途中のポリペプチド鎖がリボソームから解離してしまい, 未完成なポリペプチド鎖が溶液中に大量に放出されるということより, これらの蛋白質は細胞内の蛋白質の寿命, 即ち安定性と関連した重要な役割を持つことが示唆された。その説を裏付けるように, その後約十年にわたる研究の結果, 細胞内に直接構造を失った蛋白質を注入した場合(65), また蛋白質の分解経路(老朽化し, 構造を失った蛋白質を処理する経路)を破壊するような遺伝子変異を導入した場合(66), 遺伝子変異を導入し, 正しい構造を形成できないような蛋白質を細胞内に大量に発現させた場合(67, 68)など, いずれの場合においても熱ショック蛋白質が誘導されることが確認された。

個々の熱ショック蛋白質の同定ならびに性格付けは加速度的に進行しており, 年々その数と種類は増加している。蓄積された結果を総合すると(69), 一連の熱ショック蛋白質は異なる生物種の間でもっともよく保存されている(アミノ酸配列の相同性が高い)部類に属し, 細胞が通常の生育を行っている際にもある程度発現され, 細胞内の諸活動を円滑に進行させる役割を担ういわゆるHousekeeping Geneとしての性質を持つものも少なくない。前述したような直接蛋白質の安定性に関与している蛋白質の他に, レセプターの発現調節や細胞内のオルガネラの間の蛋白質輸送, 構造を失ったポリペプチド鎖の分解などの重要な経路に関与している知見が得られている(70)。包括的にみれば, 熱ショック蛋白質の構成員は一般に様々な蛋白質にある種の作用を及ぼしてその生理的役割を果たしているように感じられる。

表1に現在までに同定されている熱ショック蛋白質の種類をまとめた(70-86)。この表にはあくまでも現在までに研究が重点的に行われてきた熱ショック蛋白質のみが記載されており, このほかにも数多くの蛋白質が存在する。また, 記載されている熱ショック蛋白質のそれぞれについても, 引用されている例の他に数多くの研究例が存在する。しかし, この表においては代表例を2, 3挙げるだけにとどめた。

表 1. 代表的な熱ショック蛋白質の一覧

Name	Molecular Weight (kDa)	Cellular Localization	Role in Cell	Examples
Hsp100 Class	100	Cytosol, Mitochondria	Thermotolerance, Protein Degradation	yeast Hsp104(71) <i>E. coli</i> ClpA(72)
Hsp90 Class	90	Cytosol, ER	Hormone Receptor Control	Yeast Hsp90(73) <i>E. coli</i> HtpG(74)
Hsp70 Class	from 70 to 78	Cytosol, ER, Mitochondria, Chloroplasts	Protein Stabilization, Protein Transport, Protein Degradation	Yeast Kar2(75) Mammalian BiP(76) <i>E. coli</i> DnaK(77)
Hsp60/10 Class	from 55 to 60; also 10	Cytosol, Periplasm, Mitochondria, Chloroplasts	Facilitation of Protein Folding	<i>E. coli</i> GroEL(78) Yeast Hsp60(79) Mammalian Hsp58(79)
Hsp27/28 Class	from 15 to 30	Cytosol, Mitochondria, Chloroplasts, Nucleus	Cell Differentiation, Protein Folding, Thermotolerance	Human $\alpha$ A-crystallin(80) <i>Drosophila</i> Hsp27(80)
Protease Class	variable	Cytoplasm	Protein Degradation, Protein Targeting	Ubiquitin(81) <i>E. coli</i> Lon Protease(82) <i>E. coli</i> ClpP Protease(83)
Others	variable	variable	Proline Isomerization, Supportive Roles, Collagen Biogenesis?	Eukaryotic Hsp56(84) <i>E. coli</i> DnaJ(85) Hsp47(86)

表中に示した熱ショック蛋白質の中には幾つか、蛋白質の構造形成及びその安定性に直接関与することが示唆されているものも存在する。分子量約 2 万 7 千 / 2 万 8 千の Hsp27/28, 分子量約 9 万の Hsp90, 分子量約 7 万の Hsp70, そして分子量約 6 万と 1 万の Hsp60 と Hsp10 はそれぞれ蛋白質と特異的に相互作用し、その蛋白質のフォールディングもしくは構造に何らかの影響を与えることが報告されている。熱ショック蛋白質の中でも特に蛋白質と直接相互作用することが知られているこの 4 種類の蛋白質はモレキュラーシャペロン (Molecular Chaperone) と呼ばれ、ここ十数年の間に特に熱心に研究が進められている。

“Molecular Chaperone” という語句を直訳すると「分子介添え役」という言葉になる。中世ヨーロッパの社交界において未婚の貴族令嬢が初めて社交界にデビューする際、ご令嬢がよからぬ輩と交流しないようにお目付役として中年の貴婦人が随行する慣例があった。この中年婦人のことを俗にシャペロンと呼び、これにちなんで英語では Chaperon は「介添え, 補助」という動詞としての意味を持つようになった。つまり、分子介添え役、モレキュラーシャペロンは分子が他の分子と“よからぬ”相互作用を行わないために補助する役割を持つような分子の総称であり、1978 年に



LaskeyらがDNA結合蛋白質のヌクレオプラスミンに関して、ヌクレオプラスミンが、正しいDNAの凝集とヌクレオソーム形成に必須であるという性質にちなんで用いたのが初めてである(87)。

前述したモレキュラーシャペロンのうち、Hsp27/28(80)とHsp90(88)のグループに属する蛋白質は様々な細胞内の重要な活動の発現及び調節に関与することが知られており、Hsp70、Hsp60、そしてHsp10は汎用的に蛋白質の高次構造形成ならびにその調節に関与していることが知られている(47, 89)。以下に、特に本研究の研究対象となっているHsp60とHsp10に重点を置いて、これまでに蓄積された知見を要約する。

#### 1-F-1. Hsp27/28ファミリー(80)

Hsp27/28はショウジョウバエ、ほ乳類、酵母や植物の細胞などで同定されており、サブユニット分子量が1万5千～3万に分布する。共通の特徴としてアミノ酸配列内に目のレンズを構成するこのグループの一員である $\alpha$ -クリスタリンにもみられる保存された領域( $\alpha$ -クリスタリン領域)を持つことが知られている(90)。細胞内における正確な役割はまだ明らかになってはいないが、ショウジョウバエやほ乳類の細胞において、細胞が分化する際に発現が増加すること(91)、また、特定のホルモンにより誘導されることが報告されており(92)、かなり重要な細胞内機能を担っていることが示唆される。モレキュラーシャペロンとしてのHsp27/28に関する知見としては、 $\alpha$ -クリスタリンなどのHsp27/28がモレキュラーシャペロンとしての機能を発現する例が報告されている(93)。

#### 1-F-2. Hsp90ファミリー(88)

Hsp90は真核細胞、及び原核細胞ともに発現されているサブユニット分子量約9万の二量体蛋白質であり、細胞内で発現されるもっとも多い蛋白質の一つである(通常生育状態で可溶性蛋白質の約1から2%)。Hsp90は弱いATPアーゼ活性を持ち、この活性が生理的役割と関与している知見も得られている(88)。原核細胞の代表である大腸菌内で発現されるHtpG蛋白質はBardwellとCraigらにより通常の細胞の生育において欠失しても支障はなく、極めて高い温度での生育においてのみ必要であるということを示唆する知見が報告されており、いささか正確な役割は明らかではないが(74)、真核細胞内ではHsp90はある特殊な機能を持っていると思われる。即ち、細胞の情報伝達を担っているステロイドホルモンレセプター(グルココルチコイドレセプターなど)や

特定のリン酸化酵素とHsp90が相互作用している知見が報告されており(73, 94, 95), Hsp90 はこれらの情報伝達系の発現調節に関与していることが示唆されている。

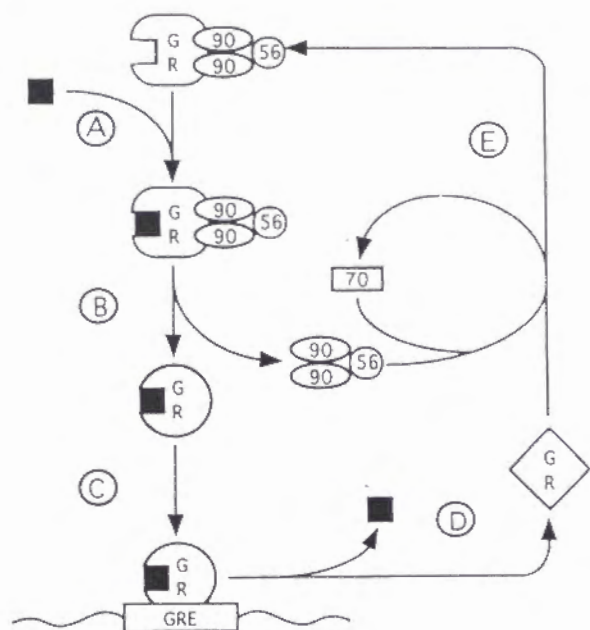


図10. グルココルチコイドレセプターの細胞内サイクル。黒い四角はホルモンに結合するリガンドであり、GRはレセプター、GREは遺伝子上のレセプター結合部位、90はHsp90、56はHsp56、70はHsp70である。説明は本文。

ステロイドレセプターファミリーとして総称される一連のホルモン需要体は細胞内において数多くの重要な遺伝子の発現調節を担っていることが知られている(図10)(96)。これらのレセプターは細胞質内において細胞外から輸送されたホルモンと結合することにより活性型になり、核内の標的遺伝子の調節領域にある特異的な配列を認識しDNA結合蛋白質のようにその遺伝子の発現を(ホルモンが結合している間のみ)調節する。ホルモンを結合していないレセプター(アポレセプター)はHsp90, そしてHsp56と呼ばれるイムノフィリンの仲間と結合し、不活性な状態(アポレセプターコンプレックス)を保っていることが知られている(図10, 最上部)(97)。細胞外からホルモンが供給されるとレセプターにホルモンが結合し(図10(A)), Hsp90とHsp56は解離し(図10(B)), 活性型のホルモン・レセプター複合体が形成される(98)。ホルモンの解離とともにレセプターは再び不活性型に変換され(図10(D)), Hsp90と次の項で紹介するHsp70と結合することにより、アポレセプターコンプレックスを再形成する(図10(E))(99)。一連の過程で、Hsp90がアポレセプターと解離する際(100), そして少なくともプロゲステロンレセプターやpp60<sup>v-src</sup>などではHsp90が結合する際にもATPが要求されることが知られている(101, 102)。総合するとグルココルチコイドなどのステロイドホルモンのレセプターは計3種の熱ショック蛋白質と相互作用しながら生理的活性を発現していることになる。

Hsp90はまた、蛋白質のフォールディングを補助する作用もあることが報告されている。宮田と矢原らはHsp90がカゼインキナーゼIIに結合し、そのアグリゲーションを抑制するとともにその活性も促進することを報告しており(103)、WiechらはHsp90が構造を失ったクエン酸合成酵素のフォールディングを特異的に補助することを報告している(104)。このHsp90のモレキュラーシャペロンとしての働きもまた、細胞の情報伝達機構の調節に関してと同様に正確な分子機構が解明されておらず、Hsp90の機能に関する知識はまだまだ不完全であるといえる。

### 1-F-3. Hsp70ファミリー(89, 94)

Hsp70は原核、真核を問わず、これまで数多くの生物の細胞内から単離されている。共通の特徴としては、高いアミノ酸配列相同性、弱いATPアーゼ活性、そして細胞からの欠損もしくは欠失により共通の表現系を示すことが挙げられる。大部分の真核生物は複数のHsp70を細胞の各オルガネラに局在した形で発現していることが知られており、それぞれ特定の細胞内経路において重要な役割を持つとされている。細胞

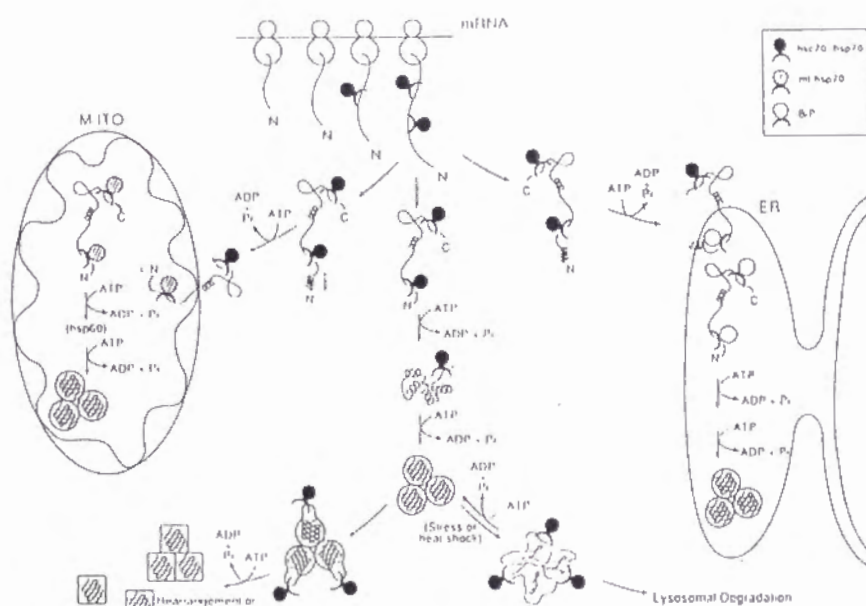


図11. 細胞内に発現されている様々なHsp70の役割を記した模式図(47)。細胞内の分布によりHsp70の色が区別されている。この図で記されているHsp70の役割は新規合成蛋白質の安定化(図上部)、蛋白質の細胞内輸送、及び輸送後の構造形成(図左右)、そして老朽化した蛋白質の処理(図下部)である。このような役割の他にも、Hsp70が熱ショック蛋白質の誘導に直接関与している知見も得られている(183)。

内のHsp70の役割は極めて多様であり、現在までに確認されている主な機能としては新規合成の蛋白質の保護(105)、合成された蛋白質の細胞内輸送(106)、熱ショックに伴い



構造を失った蛋白質のアグリーゲーションからの保護(107)、そして老朽化した蛋白質の速やかな分解(108)など、実に蛋白質の一生というべきサイクルのあらゆる側面に関与することが明らかにされている(図11)。

Hsp70のもっとも基礎的な機能は蛋白質の表面に露出したペプチド部分を認識し、これに結合することである(89)。結合した結果、標的となる蛋白質は他の同様の蛋白質との相互作用が抑制され、安定化される。結合した蛋白質はヌクレオチドATPの存在下でHsp70より解離し、それぞれの経路の次の段階に進む。このようなHsp70の基礎機能をその巨視的な生理的役割と照らし合わせると、蛋白質合成においては、1-D. で挙げたような合成途中のポリペプチド鎖のフォールディングを停止させ、ポリペプチド鎖を安定化する役割、また細胞内輸送においてはネイティブ構造での蛋白質輸送は不可能とされているので、Hsp70が結合することにより一時的に蛋白質の構造を壊し、膜内輸送可能な状態に保つ役割、そして老朽化した蛋白質の処理においては活性構造を失った蛋白質を認識し、その蛋白質が速やかに分解されるようにする役割を担うなど、それぞれの経路において中心的な役割を担うことが現在では明らかとなっている。

Hsp70が認識するポリペプチド鎖の性質に関する研究は数多く存在する。具体的な蛋白質との相互作用に関する研究は主にA. Finkの研究室(109)やL. Hightowerの研究室(110)で行われており、その結果によると、Hsp70は蛋白質のネイティブ状態を認識して結合することは希で、むしろ化学処理、遺伝子変異、あるいは補酵素の欠落によりネイティブ構造が失われた蛋白質と容易に結合することを解明した。これらの研究と対照な関係にあるのが牛の脳から単離されたHsp70の仲間であるHsc73 (Heat Shock Cognate; ある程度構成的に発現されている熱ショック蛋白質)と細胞内の小胞形成に関与している骨格蛋白質のクラスリンとの相互作用に関する研究であろう(111, 112)。Hsc73はクラスリンの会合解離を特異的に調節する役割を持ち、そして調節を受けるクラスリンの構造は分析される限りではネイティブ構造であることが解明されている。しかしこれは、Hsc73が細胞内外に栄養素や蛋白質を輸送する際に重要な膜小胞形成の調節機構と関連しているために生じた特殊例であると考えられている。事実、Hsc73も他の蛋白質との相互作用も可能であることが報告されているが、この際認識される構造形態は一般的にネイティブ状態とはほど遠いものである(109)。

Hsp70の非常に大きな役割の一つが細胞内アグリーゲーションの抑制であることを示唆する知見は数多く得られている。合成途中のポリペプチド鎖はHsp70と結合した状態

で単離することができ(105), Hsp70と結合する完全長のポリペプチド鎖はモルテングロビュールに酷似した状態にあることが確認されているので(109, 113), Hsp70が結合することにより構造を形成していないポリペプチド鎖の分子表面に露出している疎水性部位が遮蔽され, アグリゲーションが抑制されていると容易に想像できる。また, 特定の蛋白質に対して行われた*in vitro*の研究例を挙げると, 熱により構造を失い, アグリゲーションを生じたRNAポリメラーゼに大腸菌のHsp70であるDnaKを作用させるとRNAポリメラーゼはアグリゲーションを解消し, 活性な構造を形成することが知られている(107)。また, ごく最近の研究例では蛍のルシフェラーゼが温度上昇に伴い形成する不可逆なアグリゲーションはHsp70の添加により抑制される結果も得られており(114), Hsp70が少なくとも蛋白質のアグリゲーションを抑制する効果を持っており, 特殊な例においてはこのアグリゲーションを解消してしまう効果もあると考えられる。

Hsp70が具体的に認識するペプチド領域に関する研究も報告されている。まず, Hsp70が認識するペプチドの長さに関する知見であるが, 1991年にFlynnらはHsp70に数種類の異なったアミノ酸配列と長さを持ったペプチドを作用させ, それらの親和性を探ったところ, 7残基以上の, 配列内に疎水性アミノ酸残基を持ったペプチドがHsp70に強く結合することを明らかにした(115)。Hsp70に結合した状態のポリペプチド鎖の高次構造に対する知見を与えたのはLandryらのグループで, 彼らはHsp70に結合した状態のポリペプチド鎖をNMRで解析し, ポリペプチド鎖はのびきった, ほぼ直線的な構造をとっていることを解明した(116)。この知見は新規に合成されたペプチドをHsp70が認識するという知見と照らし合わせて考えると興味深い。一方, 認識されるポリペプチド鎖の配列特異性に関する極めてユニークな研究が二つのグループにより最近報告されている。この2グループは共にある種のウイルス(バクテリオファージfdまたはf1)に様々な配列を持つ短い(8~12残基)ポリペプチド鎖をコードした遺伝子を導入するとウイルス分子表面にペプチドが露出されるという性質を利用して遺伝子ライブラリーならぬペプチドライブラリーを作成し, ペプチドを露出させたファージコロニーにHsp70を作用させることにより広くHsp70に認識されるペプチドを検索し, 共通した性質をまとめた。その結果, Blond-Elguindiらは真核細胞のERに局在されるHsp70であるBiPの認識特異性を詳細に調べ(117), BiPは配列内に疎水性アミノ酸残基がひとつおきに並んだ配列をもっとも頻繁に認識することを解明した。この結果を先のLandryらの研究と共に考えるとHsp70はのびきった構造のポリペプチド鎖を分子の片側に局在した疎水性アミノ酸残基を介して結合すると考えられる(図12)。こ



の結果と本質的には同一のものをGragerovらは大腸菌由来のHsp70であるDnaKについて確認している(118)。

以上の一連の結果をまとめると、Hsp70は何らかの要因で構造を形成していない蛋白質の分子表面に露出した疎水的ペプチド領域を認識・結合し、フォールディングの進行を抑え、アグリゲーションを防ぐ。ヌクレオチドATP存在下でHsp70はこのペプチドを解離させ、解離したペプチドはフォールディング、膜間輸送、もしくは分解といった細胞内過程へと供される。

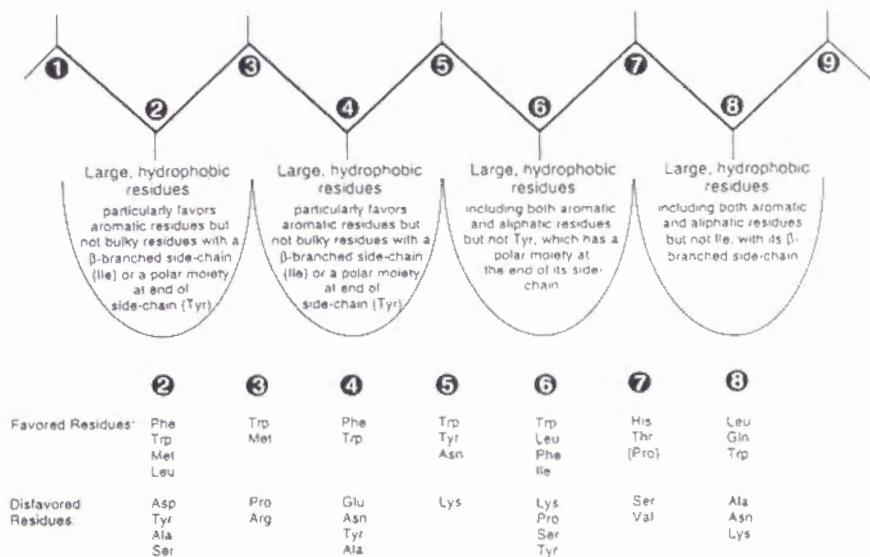


図12. Blond-Elguindiらが解明した、ERに局在するHsp70であるBIPのペプチド結合特異性を示した模式図(117)。ペプチドライブラリーより検出されたペプチドの特徴をまとめると、BIPは一つおきのアミノ酸側鎖を認識し(図中では偶数番目の残基の側鎖)、結合する。認識された主なアミノ酸残基は図下部の“Favored Residues”欄に、特に認識されない傾向が高い残基はその下の“Disfavored Residues”欄に記されている。

#### 1-F-4. Hsp60/10ファミリー—大腸菌由来GroEL・GroES蛋白質を中心に(89)

1973年において、C. GeorgopoulosとN. Sternbergらは大腸菌に感染するウイルスの一つであるバクテリオファージλの感染機構を解明する研究を行っている際、感染した後にファージλが増殖できない大腸菌の変異型菌株を数種類単離した(119, 120)。これらの大腸菌は自分自身の染色体遺伝子に変異が生じたためにファージλの増殖を不可能にしたことがわかり、これより野性型の大腸菌は自分の敵ともいえるファージをいわば手助けしているという興味深い事実が明らかになった(121)。変異株の一つはファージ侵入後に増殖が開始されるとファージ頭部の形成が不完全になるような表現系を示した。この大腸菌の変異遺伝子は、ファージの頭部の構造遺伝子の一つで

あるE遺伝子を更に変異させると表現系が野性型に戻ることが明らかとなった(119, 120)。この事実と、変異された大腸菌の遺伝子がファージの増殖 (Growth) を (野性型では) 補助する役割を持つことを理由でこの遺伝子はGroE遺伝子と名付けられた。

1979年にR. Hendrix が(122), そして1986年にChandrasekharらが(123)GroE遺伝子の二種の遺伝子産物, GroELとGroESを単離精製することに成功した。GroELは分子量約5万7千のサブユニットが14個会合した巨大オリゴマー蛋白質であり, その四次構造が生物界ではあまり見かけない7個のサブユニットがリング状に会合したものを2つ, 同軸状に重ねた7回軸対称の“ダブル・ドーナッツ (Double Doughnut)”型構造であった (図13)。また, GroEL蛋白質は弱いATPアーゼ活性を持つこともHendrixは確認した。一方, GroES蛋白質はサブユニット分子量が約1万5千の7量体のオリゴマー蛋白質で, GroELと同様7回軸対称のリング状の四次構造を形成することが確認された。Chandrasekharらが確認したGroESの機能はGroELのATPアーゼ活性を阻害するもので(123), ATPとマグネシウムイオン存在下でGroESはGroELと結合する事も確認した。後に真核細胞内ミトコンドリアや植物においてHsp60/10として同族の蛋白質が同定されるが, 熱ショック応答という現象が正式に報告される前にすでに発見されていた原核細胞由来のこの二種類の蛋白質, GroELとGroESは今でもHsp60/10ファミリーのみならず, モレキュラーシャペロン全般を通して最も重点的に研究が行われている蛋白質の一つである。

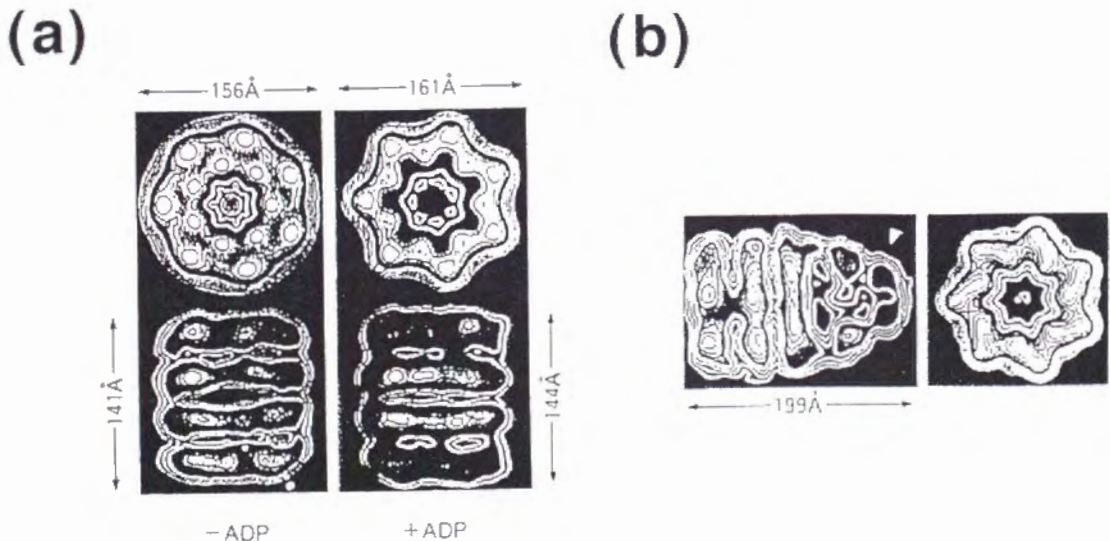


図13. GroEL, GroESの電子顕微鏡写真 (文献(154)より引用, 原典は(184))。 (a)はGroELのヌクレオチドADPを結合しない構造と結合した構造を対称軸に対し平行と垂直の方向から見た図。電子顕微鏡でもGroELのヌクレオチド結合に由来する構造変化が確認される。 (b)はGroELにGroES 7量体が結合した様子。 (b)の左側の図に記された白矢印はGroESの結合している部分を示している。それぞれの写真の横に分子のおよその大きさが記されている。



1988年にHemmingsenらがGroE遺伝子の全塩基配列を報告した(124)。GroE遺伝子は正確には2個の構造遺伝子、GroES遺伝子とGroEL遺伝子が共通の遺伝子発現調節領域に制御されるオペロンであり、GroES遺伝子とGroEL遺伝子は一つのmRNAに転写され、それぞれの翻訳開始点よりポリペプチド鎖に翻訳される。遺伝子配列より類推されるGroELのサブユニット分子量は57,259、アミノ酸残基数は549残基で、アミノ酸組成の特徴としては芳香族アミノ酸が極めて少なく（中でもトリプトファン残基は存在しない）、逆に脂肪族アミノ酸が異常に多い点が上げられる。GroES蛋白質の推定分子量は10,368、アミノ酸残基数は97残基であり、GroELとほぼ同様のアミノ酸組成の特徴を持っていることが明らかになった。Hemmingsenらはまた、植物の葉緑素から単離されたほぼ同じ分子量（6万）を持つRubisco Binding Proteinの遺伝子配列も併せて報告し、アミノ酸配列相同性からこの蛋白質とGroELは同一ファミリーの蛋白質であると提唱した。彼らは異なる生物種から配列の似通った蛋白質が発見されたことをきっかけにHsp60/10ファミリーを新しく、シャペロニン（Chaperonin）ファミリーと名付けた。

シャペロニン蛋白質の生理的機能に関する微視的な知見を与える研究成果は1989年頃に報告され始めた。Goloubinoffらは光合成細菌の*Rhodospirillum rubrum* 由来の炭酸固定酵素であるリブローズビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ（Rubisco）を大腸菌内で発現させようとする際、GroELとGroESが活性Rubiscoを発現させる上で重要な役割を担っていることを発見し(125)、実際にGroEL、GroES、そしてRubiscoを細胞より精製し、*in vitro*の系でRubiscoを構造形成させ、GroELとGroESの役割を探った(126)。*In vitro*においてRubiscoのフォールディング反応はほとんど不可逆なもので、ネイティブ構造の形成を示唆する活性の回復は観測されなかった。そこで、精製されたGroELとGroES、ならびにATPを添加して同じ実験を行うと、活性回復率は約80%になり、*in vitro*においてもRubiscoのフォールディングが成功するためにはシャペロニンの存在が必要であることがわかった。より詳細な実験を行った結果、Rubiscoの自発的なフォールディング反応は、反応途中で形成される中間状態Rubisco-Iがアグリゲーションを形成するために成功しないことが解明され、GroELはこのRubisco-Iに特異的に結合し、安定化することによりアグリゲーションを抑制する効果を持つことが明らかとなった。この後、GroESとATPの添加によりGroELがATPを加水分解し、Rubiscoが解離し、フォールディングが再開される。従って、Rubiscoのフォールディングを補助する主な役割を担うのがGroELであり、GroESとATPはこの機

能の調節ならびに補助の役割を担うと結論づけられた。更にその翌年、同じ研究室の Viitanen らは GroEL の作用、正確には GroEL の A T P 加水分解活性の発現にはカリウムイオンが必要であることを報告した(127)。A T P 加水分解と GroEL の効果との密接な関係を観察した Viitanen らは、この A T P 加水分解の役割を GroEL と結合した Rubisco が再び解離するために要するエネルギーの供給を担っているのではないかと提唱した。

1991年にGroELがアグリゲーションを抑制するということを実験的に確認する結果が報告された。BuchnerらはGroELとGroESを豚心臓由来のクエン酸合成酵素のフォールディング反応中に添加しその効果を調べたところ、GroELはクエン酸合成酵素の構造形成反応途中のアグリゲーションを能率よく抑制していることを光散乱分析（分子の大きさを定性的に評価する実験法）により直接確認した(128)。この結果よりGroELが蛋白質の構造形成中に生じやすいアグリゲーションを抑制する効果を持つことが検証され、これまでにアグリゲーションなどが原因でフォールディングが不完全であった蛋白質に対し、GroELの効果を探る研究が続々報告されるようになった。

表2に1994年までにGroEの効果が確認された蛋白質の名前と諸性質を記した(125-154)。表を概観すると、GroELにより構造形成中のアグリゲーションが抑制される蛋白質はその由来、サブユニット分子量、ならびに四次構造にいっさい共通性が見いだせないことがわかる。また、この表中の具体例以外にも、Viitanenらは大腸菌の粗酵素溶液を変性剤で処理した後、希釈法によりまとめてGroEL存在下でフォールディングを行わせると、大腸菌の粗酵素溶液に含まれる蛋白質の少なくとも半数がGroELと結合していることを確認した(155)。従って、大腸菌内においてもGroELに認識されうる、いわゆる標的蛋白質はかなり多く、構造を形成する途中の蛋白質のアグリゲーションを抑制するというGroELの効果は大腸菌の中で汎用的かつ重要なものであることが示唆される。

Lorimerらの研究によりGroELが様々な蛋白質の構造形成反応中のアグリゲーションを抑制する効果を持つことは明らかとなったが、Lorimerらの研究のみではGroELが具体的にどのような機構を経てこの効果を発現するのかは解明されるに至らなかった。GroELの作用機構に関する詳細な情報は、その後約3年間にわたって行われた数多くの研究から得られた。まず1991年にHartlらは二種類の単量体蛋白質、鶏のジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)と牛の肝臓由来のロダネーゼを用いてフォールディングの研究を行い、GroELと結合した状態における蛋白質の構造的特性とGroEとの相互作用を構成する各反応の性質を分析した(130)。DHFRとロダネーゼは共にGroELに

表2. GroE が構造形成反応に関与する酵素・蛋白質

酵素・蛋白質名	質量(四次構造)	由来	文献
<u>単量体</u>			
リボヌクレアーゼ(バーナーゼ)	12 kDa ( $\alpha_1$ )	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Gray & Fersht (129)
ジヒドロ葉酸還元酵素	20 kDa ( $\alpha_1$ )	chicken mouse	Martin et al.(130) Viitanen et al.(131)
$\beta$ -ラクタマーゼ前駆体	30 kDa ( $\alpha_1$ )	<i>Escherichia coli</i>	Lamint et al (132)
ローダニーズ	33 kDa ( $\alpha_1$ )	bovine	Martin et al.(130) Mendoza et al.(133)
リボヌクレアーゼ (in vivo)	~40 kDa ( $\alpha_1$ )	human granulocyte	Rosenberg et al.(134)
6-ヒドロキシ-D-ニコチン オキシダーゼ	48 kDa ( $\alpha_1$ )	<i>Escherichia coli</i>	Brandsch et al.(135)
免疫グロブリン Fab フラグメント	~50 kDa ( $\alpha_1$ )	mouse	Schmidt & Buchner(136)
タカアミラーゼA	54 kDa ( $\alpha_1$ )	<i>Aspergillus oryzae</i>	Kawata et al.(137)
糖鎖非結合インペルターゼ	59 kDa ( $\alpha_1$ )	yeast	Kern et al.(140)
$\alpha$ -グルコシダーゼ	68 kDa ( $\alpha_1$ )	yeast	Holl-Neugebauer & Rudolph(138)
<u>2量体</u>			
Cu, Zn-スーパーオキシド ジスムターゼ	32 kDa ( $\alpha_2$ )	<i>Xenopus laevis</i> , human	Battistoni et al.(139)
クエン酸合成酵素	50 kDa ( $\alpha_2$ )	pig	Buchner et al.(128)
乳酸脱水素酵素	64 kDa ( $\alpha_2$ )	<i>Staphylococcus</i> sp.	Kawata et al.(137)
	68 kDa ( $\alpha_2$ )	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Badcoe et al.(141)
リンゴ酸脱水素酵素	54 kDa ( $\alpha_2$ )	<i>Thermus</i> sp.	Kawata et al.(137)
	70 kDa ( $\alpha_2$ )	pig	Hartman et al.(142)
ルシフェラーゼ (in vivo)	74 kDa ( $\alpha_1\beta_1$ )	<i>Vibrio harveyi</i> MAV	Flynn et al.(143) Escher & Szalay(144)
エノラーゼ	94 kDa ( $\alpha_2$ )	yeast	Kubo et al.(145)
グルコース-6-リン酸脱水素酵素	109 kDa ( $\alpha_2$ )	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Hansen & Gafni(146)
リブローズニリン酸 カルボキシラーゼ (in vivo)	110 kDa ( $\alpha_2$ )	<i>Rhodospirillum rubrum</i>  <i>Anacystis nidulans</i>	Gokubinooff et al.(126) Viitanen et al.(127) van der Vies et al.(147) Gokubinooff et al.(125)
フィトクローム 光受容体	248 kDa ( $\alpha_2$ )	oat	Grimm et al.(148)
<u>3量体</u>			
オルニチントランスカルバミラーゼ	108 kDa ( $\alpha_3$ )	rat	Zheng et al.(149)
テイルスバイク蛋白質	216 kDa ( $\alpha_3$ )	<i>Salmonella</i> phage P22	Brunschier et al.(150)
<u>4量体</u>			
グルコース脱水素酵素	105 kDa ( $\alpha_4$ )	<i>Bacillus</i> sp.	Kawata et al.(137)
分岐鎖 $\alpha$ -ケト酸 デカルボキシラーゼ E1 (in vivo)	160 kDa ( $\alpha_2\beta_2$ )	mammalian	Wynn et al.(151)
トリプトファナーゼ	208 kDa ( $\alpha_4$ )	<i>Escherichia coli</i>	Mizobata et al.(152)
<u>12量体</u>			
グルタミン合成酵素	622 kDa ( $\alpha_{12}$ )	<i>Escherichia coli</i>	Fisher(153)



結合し、構造形成中に形成されるアグリゲーションが抑制されることが確認された。興味深いのはそれぞれの標的蛋白質がGroELに結合した際の構造であり、その構造はネイティブ状態とほぼ同じ強度の蛍光スペクトル、そしてANSに対する強い親和性を見せる一方でネイティブ状態よりも蛋白質分解酵素に容易に分解されるという性質を見せた。この結果よりHartlらは、GroELに結合する蛋白質はかなりの高次構造成分（二次構造の形成、及びその構造成分の会合による疎水領域）の形成を完了させているものの、蛋白質分解酵素に対する保護効果をもたらす明確な三次構造が形成されていない様な構造、即ちモルテングロビュールに固有の特徴を数多く持っている構造を持つと結論した。更に興味深いことに、Hartlらはこの研究においてロダネーゼの構造形成中にGroELが消費するATPの量を試算し、1分子のロダネーゼが構造を形成するまでに約100分子のATPが消費されるという結果を得た。これは、ロダネーゼが構造形成を行っている反応中にLorimerらが提唱したATP結合・加水分解の手順を何回も繰り返していることを示した。

フォールディング反応中にGroELが100分子以上のATPを消費する事実に注目してイギリスのClarkeらはGroELとヌクレオチドとの相互作用に注目し、詳細な知見を報告した(141)。彼らは*Bacillus stearothermophilus*由来の乳酸脱水素酵素(LDH)のフォールディング反応を用いて、GroELとLDHとの親和性の移り変わりを詳細に解析したところ、GroELがATPを結合するとGroELとLDHとの結合親和性が低下し、LDHの解離が促進されることを見いだした。蛋白質を解離したGroELはその後ATPを加水分解し、ADP結合型を形成した後、再び蛋白質と結合できる状態を形成することを示した。ClarkeらのモデルにおいてはLorimerらと異なり、ATP加水分解の役割はエネルギーを獲得するために行われるのではなくむしろGroELの構造を調節するためのものであるとされた。この結論に至ったのは、Clarkeらが行った研究においてLDHはATPが反応系に添加された場合はもちろん、ATPと構造は類似しているが加水分解されない分子を添加しても同様にフォールディングが進行することを確認したため、Clarkeらはこの事実をもとに、GroELと標的蛋白質の間の相互作用はヌクレオチドの結合と共に弱くなると判断したのである。時をほぼ同じくして同様の結果が世界各地の研究室でも得られた(131, 141, 145, 152)。続いて、同じ研究室のJacksonらはGroELに蛍光修飾試薬のピレンマレイミドを結合させ、ヌクレオチド結合に伴うGroELの構造変化を蛍光スペクトル分析により解析し、ヌクレオチドの結合解離機構を直接詳細に解析した(156)。彼らの結果によれば、GroELはATPの結合と共に大規模な構

造変化を起こし、この構造変化が標的蛋白質との親和性を低下させる。続いてGroELがATPを加水分解し、ADPを結合した状態になると再び標的蛋白質を強く結合するようになるという、ATP結合構造－ADP結合構造のサイクルが繰り返されると彼らは報告した。GroELのATP結合構造に弱く結合した標的蛋白質はGroELと結合したままでフォールディングを行い、再びADP構造と結合する際はGroELとの親和性が以前に比べて若干低下した構造になる（分子表面の疎水領域が構造形成により遮蔽されるため）。このサイクルを繰り返すと次第に標的蛋白質の構造が形成され（また、GroELと結合したままであるからアグリゲーションからは防がれる）、それに伴いGroELとの親和性も低下して最終的にはGroELと相互作用しなくなり、活性な構造が溶液中に放出されるというメカニズムをJacksonらは提唱した。また、Jacksonらは、この論文でGroELが誤った構造を形成したためにネイティブ構造がもはや形成できないような分子種に結合すると、再びネイティブ構造の形成を試みることができるようこの分子種の構造を壊す作用があるという、これまで考えられていなかったGroELのフォールディングにおける積極的な役割の存在を提唱した。

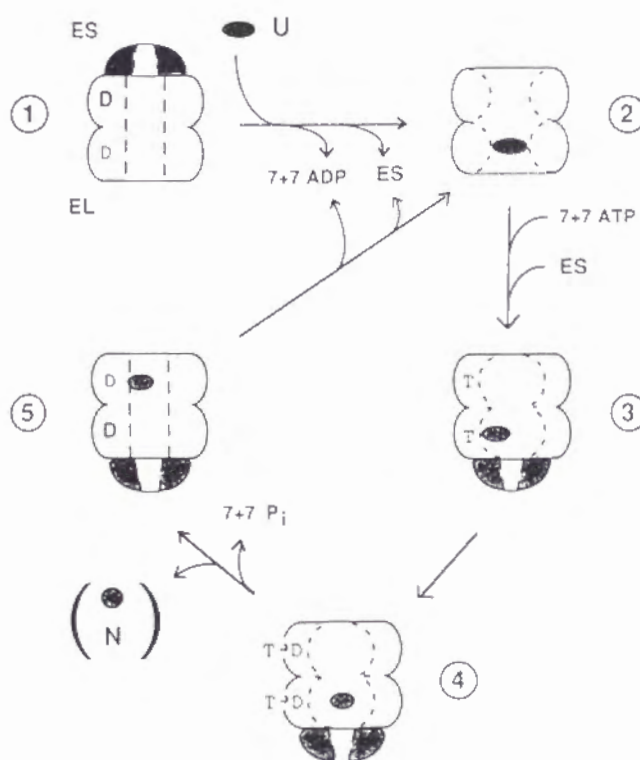


図14. Martinらが提唱したGroEL・GroESの作用機構(157)。図中のEL, ES, UはそれぞれGroEL, GroES, そして標的蛋白質を示し、GroELの模式図の内部に記されているDならびにTはそれぞれADPとATPの結合した状態を示す。太字に記されているDはGroELとの結合が強く、解離されない状態を示している。具体的な作用機構の概略は本文中に記した。



このメカニズムを発展させてGroESの効果まで包括的に説明しようとした研究が1993年のMartinらの研究である(157)。彼らはGroELとGroES、ならびにATPと二種類の標的蛋白質、クエン酸合成酵素とロダネーゼを用いて、GroELの作用機構の各段階を詳細に分析していった。彼らが解明した最も重要な事実GroESと標的蛋白質が互いに対し同様の効果を見せることである。即ち、GroESがGroEL・標的蛋白質複合体に結合すると、GroELと標的蛋白質の間の相互作用が弱まり、標的蛋白質が解離しやすくなる。逆にあらかじめ形成されたGroEL・GroES複合体に標的蛋白質が結合するとGroELとGroESの間の相互作用が弱まり、GroESが解離するのである。この知見を基礎にしてMartinらは詳細な研究を行い、上に記したようなモデルを提唱するに至った(図14)。

GroELとGroESにATPを加えて反応を行わせた後にゲル濾過クロマトグラフィーでGroELを単離するとGroESの7量体と7分子のADPがGroELの14量体に結合して同じ画分に溶出した。このことから細胞内(ATPが豊富に存在している状態)におけるGroELはGroESと7分子のADPが結合していると考えられた(状態1)。このGroEL・GroES複合体に標的となる蛋白質が結合するとGroESならびにADPの結合が弱くなってそれぞれ解離し、GroELと標的蛋白質が結合したGroEL・蛋白質複合体が形成される(状態2)。次に、この複合体にATPが結合し(状態3)、更にGroESが結合すると実験で確認されたようにGroELの標的蛋白質に対する親和性が弱まり、標的蛋白質が解離する(状態4)。GroELから解離した蛋白質が速やかに他の蛋白質と結合してアグリゲーションを形成しないことを説明する機構としてMartinらは解離した標的蛋白質がGroELの二つのリングにより形成される中心の“穴”の中に存在し、さながら籠に囲まれた状態で外界から遮蔽されてフォールディングが進行すると提唱した。途中、何度も籠の側壁を形成するGroELと結合し(状態5)、その度にGroESの解離、ならびにATPの交換、そして標的蛋白質の解離(状態2から4)というサイクルを繰り返す。最終的にはGroELが結合できない構造を形成してGroELの籠から抜け出す、というモデルである。総合的な効果としてGroELは構造形成中の蛋白質を外界から遮蔽し、アグリゲーションの危険性がない状態でフォールディングが進行できるような環境をつくっていることになる。Martinらのモデルの根底にはJacksonらのモデルと同様、一分子の標的蛋白質と一分子のGroELが最後まで相互作用しながら立体構造を形成するという考えがあった。

このように、GroEの作用機構がMartinらによって一見完全に解明されたかに見え



たが、その後の研究で、このモデルに矛盾する結果も得られてきた。まず、GroELと標的蛋白質が1対1の関係を保ち続けることを検証するためにLorimerらは放射性同位元素でラベルした標的蛋白質のRubiscoをあらかじめGroELと結合させ、大量のラベルされていないRubiscoフォールディング中間体、そして極めて微量のATPを添加し、GroELに標的蛋白質の結合・解離を1サイクルのみ行わせ、その直後にGroEL標的蛋白質の複合体を再単離した(158)。もしMartinらのモデルが正しければ、大量のラベルされていないRubiscoが存在している中でGroELを1回結合解離させても放射性ラベルされたRubiscoはGroELとの関係を保つはずなので、再単離されたGroEL・標的蛋白質複合体にあるRubiscoの大部分はラベルされたもののはずである。しかし、実際はわずか一回のサイクルのみでGroELに結合していたラベルされたRubiscoの量は最初の40%以下に減少していた(158)。この結果はGroELとRubiscoの相互作用はMartinらが提唱したような1対1の関係を保った反応ではなく任意のRubisco分子が複数のGroEL分子と結合し、解離する反応であることを示唆するものである。ほぼ同じ時期にYale大学のA. Horwichらの研究室でいったん標的蛋白質を結合すると解離させることのできない、標的蛋白質のトラップとして働くようなGroELの変異体を用いて同様の結果を得た(159)。Lorimerらが行った研究と本質的には一緒で、あらかじめ野生型のGroELと結合したロダネーゼまたはオルニチントランスカルバミラーゼを調製し、溶液中に上記の性質を持ったGroELの変異体が存在する中でATPとGroESを添加し、最終的な活性回復率を測定した。もし標的蛋白質が野生型のGroELと1対1の関係を保ち続けるならば、標的蛋白質のトラップとして働く変異体GroELの添加は活性回復率に影響を及ぼさないはずである。ところが、結果的には変異体酵素の一部に標的蛋白質が捕捉されてしまうことが確認された(159)。つまり、標的蛋白質はGroEL存在下で構造を形成させると、数多くのGroEL分子と結合・解離を繰り返しながら構造を形成していくと考えざるを得ない。

1994年にYale大学のグループの共同研究によりGroELのX線結晶構造解析による立体構造が解明された(図15)(160)。それによると、GroELはこれまでに提唱されている14量体の四次構造を形成していることが確認され、更にポリペプチド鎖のどの領域がヌクレオチドの結合、標的蛋白質との相互作用、そしてGroELの四次構造形成に関与しているのかが明らかにされた。

GroELは主に3つの三次構造単位即ちドメインからなる。最も大きいドメインは二つのリングが会合する面を形成しているEquatorial(赤道上の)ドメインであり、この

ドメインの内側（リングの穴の面）にヌクレオチド結合部位が存在する。標的蛋白質が相互作用すると思われる第2のドメインがApical（頂上の）ドメインで結晶構造の中では分子のゆらぎのため解像度が最も悪くなっている。これは、Apicalドメインが様々な標的蛋白質を認識するために自由度の高い構造を形成しているためであると考え

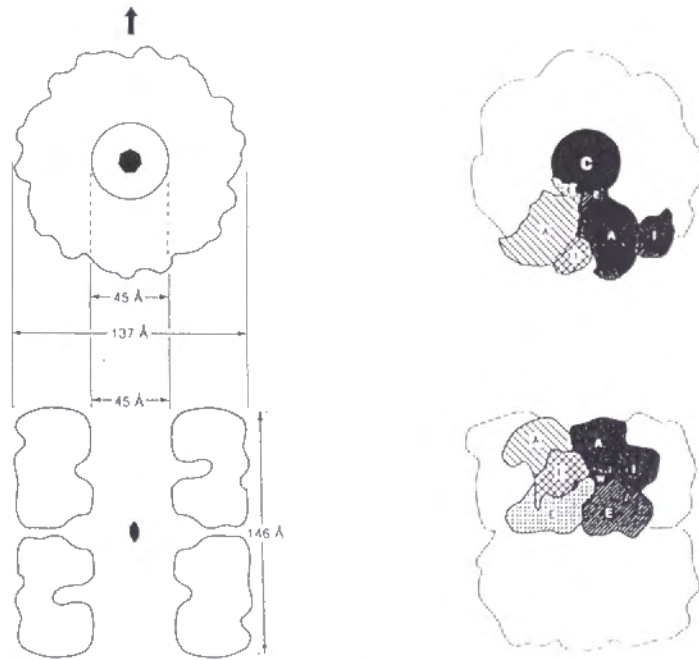


図15. X線結晶構造解析より求められたGroELの四次構造ならびにドメイン配置(160)。左の図はGroELの全体構造を対称軸に対し垂直方向と平行方向から眺めた断面図である。分子の寸法ならびに中心にある穴（Central Cavity）の直径が記されている。右の図がGroELの構成サブユニットのうち2個のサブユニットの三次構造をドメイン別に色分けし、全体構造における相対的な配置を示した図。図中のA, I, Eと記されている部分はそれぞれApical Domain, Intermediate Domain, そしてEquatorial Domainを指す。CはCentral Cavity, そしてWは2つのサブユニットの接触面に生じた、分子内部に通じる通路で、この研究の筆者らはこの通路からヌクレオチドが侵入し、サブユニット内側にあるヌクレオチド結合部位に結合するのではないかと提唱している。

られている。この二つの機能ドメインをつなぐ鋸となるドメインがIntermediate（中間の）ドメインである。ポリペプチド鎖はリングの内部にN末端があると思われ、順にEquatorial → Intermediate → Apical → Intermediate → Equatorial と進み、C末端はN末端に極めて近い場所にあると思われる（ゆらぎが激しいために結晶構造でN末端5残基とC末端24残基は見えない）。

結晶構造から明らかになったもう一つの興味深い結果はリングの大きさに関する知見である。リングの内径は約45 Åであり、ポリペプチド鎖がモルテングロビュール構造のような状態にある場合の平均体積と照らし合わせると分子量約6万のポリペプチド鎖がその内部に完全に収まる限界の分子量であり、構造が絶えず変化していることも考慮すれば実際の限界分子量はもっと小さいと推察された。この構造のデータ

を用いれば、GroELのリングの中にはごく小さいポリペプチド鎖しか入りきれないことになり、やはりMartinらのモデルを完全に支持する結果ではなかった。

このように、シャペロニンの作用機構に関する知見が徐々に蓄積され、年々分子レベルでのメカニズム解明が進められている。前述したBuchnerらの研究が発表された時期（1991年）とほぼ同時期に申請者の研究は開始され、現在に至るまでシャペロニンの作用機構に関する研究を、主として二種類の標的蛋白質を実験対象に用いて行ってきた。

#### 1-G. 本研究の標的蛋白質その1：トリプトファナーゼについて

トリプトファナーゼ（L-tryptophan indole lyase (deaminating), EC 4.1.99.1）はトリプトファンを分解し、ピルビン酸、アンモニア、そしてインドールを化学量論的に生成する酵素である(161)。本酵素は、トリプトファンの分解の他に、各種化合物の $\alpha$ 、 $\beta$ 脱離反応及び $\beta$ 置換反応をも触媒する(162)。



(R: -OH, -SH, -SCH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, indole group, etc.; R': indole group)

大腸菌由来のトリプトファナーゼは471残基のアミノ酸からなる推定分子量52,242 (163, 164)のポリペプチド鎖4本からなるオリゴマー酵素で(165)、活性発現にカリウムやアンモニアなどの一価陽イオン(166)、ならびに補酵素ピリドキサル5'-リン酸 (PLP) を必要とする (161)。

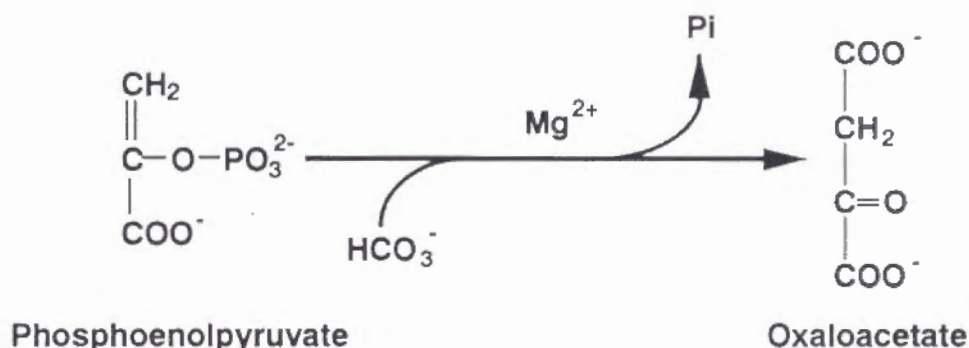
トリプトファナーゼに関するフォールディングの研究は1974年にLondonらによって初めて報告された(167)。彼らの研究によると、トリプトファナーゼを4M尿素存在下で完全に変性させた後、透析により尿素を取り除くと、完全に活性を回復できることを示した。しかし、この活性回復は非常に透析中のトリプトファナーゼの濃度に依存しており、高濃度の変性したトリプトファナーゼ溶液を透析すると活性が回復せず、不可逆なアグリゲーションを形成することを報告した。この事実をもとにLondonらは、トリプトファナーゼが構造形成途中にアグリゲーションを生じやすい疎水性部位を持った中間体を形成し、高濃度ではこの中間状態がアグリゲーションを形成すると提唱した。しかし、それ以上のフォールディングに関する情報は透析による



フォールディング反応で観測することは困難であったために行われていない。

# 1-H. 本研究の標的蛋白質その2：ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) について

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC; EC 4.1.1.31) はマグネシウムイオン存在下でホスホエノールピルビン酸に炭酸イオンを固定し、オキサロ酢酸を生成する反応を触媒する酵素である(168)。以下にその反応式を示した。



本酵素は高等植物や原生動物、及び細菌類において発現される酵素であり(169)、中でもとうもろこしなどの高い光合成能を持つC<sub>4</sub>植物においては初期炭酸固定酵素として空気中の炭酸を代謝可能な有機化合物に変換する重要な役割を担っている(170)。大腸菌においても本酵素は発現されており、大腸菌内では代謝系のKrebs回路にオキサロ酢酸を補充する経路に関与している(171, 172)。大腸菌由来のPEPCは代謝経路に関与しているためか、非常に数多くのリガンドにより活性が調節されるアロステリック酵素であり、アセチルコエンザイムA (CoASAc) (173, 174)、フルクトース1, 6-ビスリン酸(175)、GTPまたはグアノシン3'-二リン酸5'-二リン酸(細胞内の飢餓信号の役割を持つヌクレオチド) (176)、脂肪酸または脂肪酸のコエンザイムA誘導体(177)のそれぞれにより活性化を受け、逆にリンゴ酸やアスパラギン酸(178, 179)などの代謝産物により阻害される。

大腸菌由来のPEPCは883アミノ酸残基からなる分子量99, 061のポリペプチド鎖(180, 181)が4個会合したオリゴマー酵素である。そのサブユニット分子量からも推察されるように、極めて実験室条件下におけるフォールディングは困難であり、現在までに本酵素のフォールディングを*in vitro*で成功させた例は報告されていない。しかし、大腸菌内において活性な状態で発現されているのは確かであるので、細胞内

においてある種の補助機構が存在し、この機構のためにPEPCのフォールディングが可能になっていると考えられた。そこで、この機構を担う最も適当な候補と思われる大腸菌由来のシャペロニンGroEL・GroESを用いて、実験室内においてPEPCのフォールディング反応を再現しようと試みた。

## 1-I. 本研究の流れ及び主要な成果

本研究は、オリゴマー蛋白質のフォールディング反応の性質を解明し、それをもとにオリゴマー蛋白質が構造を形成する際の一般的な法則を見いだすことを主目的にしていた。しかし、研究を行う過程で、選択した蛋白質がフォールディング中に極めてアグリゲーションを形成しやすいことが判明し、このアグリゲーションを抑制する手段としてシャペロニンを用い、その後は研究対象としたオリゴマー蛋白質とシャペロニンGroEL・GroESとの関係、ならびに自身非常に複雑なオリゴマー蛋白質であるGroELのフォールディングに関する情報を求めるに至った。研究の流れを反映して、本研究の結果は大きく以下の4種類に分類されることができる。

1. 大腸菌由来の4量体蛋白質であるトリプトファナーゼを用い、その変性反応とフォールディング反応の特徴を分光学的手法により解析した。
2. トリプトファナーゼのフォールディング反応中に生じるアグリゲーションを抑制する手段としてGroEL・GroESを用い、これら2種のシャペロニンがどのような機構を経てトリプトファナーゼのフォールディングを補助しているのかに関する知見を得た。
3. 14量体という、生物界では極めて珍しい四次構造をもつGroEL蛋白質について、変性剤Gdn-HCl存在下における変性反応を解析し、その四次構造に関する知見を得た。
4. 大腸菌由来の別の4量体酵素、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC）のフォールディング反応において、トリプトファナーゼと同様GroELがアグリゲーションを抑制することができることを解明した。しかし、その効果発現の様式はトリプトファナーゼの場合と数多くの相違点がみられ、GroELの作用機構の本質に関する重要な知見を得ることができた。

## § 2. 材料と方法

### 2-A. 試薬

以下に本研究で使用した試薬及び消耗品，ならびにその購入先を記す。

半井化学薬品（株）：塩酸グアニジン（Gdn-HCl），*N*-2-ヒドロキシエチルピペラジン-*N'*-2-エタンスルホン酸（HEPES），ジチオスレイトール（DTT），トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（Tris），アクリルアミド，*N*，*N'*-メチレンビスアクリルアミド（Bis），*N*，*N*，*N'*，*N'*-テトラメチルエチレンジアミン（TEMED），モリブデン酸アンモニウム，水素化シアノホウ素ナトリウム，エチレンジアミン四酢酸（EDTA），ポリエチレングリコールモノ-*p*-イソオクチルフェニルエーテル（Triton X-100），PLP，乾燥酵母エキス

和光純薬工業（株）：マラカイトグリーンシュウ酸塩，ドデシル硫酸ナトリウム（SDS），硫酸アンモニウム，トリクロル酢酸（TCA），ホスホエノールピルビン酸（トリシクロヘキシルアンモニウム）塩（PEP），無水酢酸，コエンザイムA（CoASH），過塩素酸

協和発酵工業（株）：PLP

日本製薬（株）：ポリペプトン

同仁化学研究所：核酸合成用ジオキサン

Merck：ポリエチレングリコール4000（PEG）

SIGMA：牛血清アルブミン（BSA），アデノシン5'-三リン酸（ATP），アデノシン5'-二リン酸（ADP），アデノシン5'-*O*-(3チオリン酸)（ATP- $\gamma$ -S），5'-アデニリルイミド二リン酸（AMP-PNP），還元型 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）

オリエンタル酵母（株）：アデノシン5'-三リン酸（ATP），還元型 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）

アマシャム社：Adenosine 5'-[ $\gamma$ - $^{32}$ P] Triphosphate（放射能比活性約 3000 Ci/mmol）

天野製薬（株）：リンゴ酸脱水素酵素（MDH）（*Thermus* 種由来）

Boeringer-Mannheim：クエン酸合成酵素（豚心臓由来）

Pharmacia Biotech（株）：PD-10 Sephadex 脱塩カラム，Q-Sepharose 陰イオン交換樹脂および Superdex 200 HR 10/30 充填済みゲル濾過クロマトグラフィーカラム

東ソー（株）：Butyl Toyopearl 650M 疎水性クロマトグラフィー樹脂

日本バイオ・ラッドラボラトリーズ（株）：Bio-Gel SEC 40-XL 高速液体クロマトグラ



フィー（HPLC）用ゲルろ過カラム，Bio-Rad Protein Assay Kit

アドバンテック東洋（株）：限外濾過膜ウルトラフィルターUP-20，濾過容器ウルトラホルダー

アミコン：遠心濃縮器Centricon-30

その他の試薬は生化学用特製試薬を半井化学薬品（株）ならびに和光純薬工業（株）より購入した。

トリプトファナーゼの活性測定に利用する合成基質のS-（*o*-ニトロフェニル）-L-システイン（SOPC）は当研究室において合成した。合成法はPhillipsらの方法(185)に従って行った。

PEPCの活性測定に利用する生理的活性化因子のアセチルコエンザイムA（CoASAc）もまた当研究室にてCoASHと無水酢酸より合成された物を使用した。合成法はSimonとSheminらの方法(186)に従って行い，簡単に述べると，20 mMのCoASH水溶液を作成しこれを氷上で攪拌しながら無水酢酸を滴下していくことにより合成反応を進行させる。この際，アンモニア水を用いてpHを8～9に保ち続けた。反応の進行具合はコエンザイムAの遊離チオール基に反応し，黄色く呈色する発色試薬，5，5'-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸）（DTNB；エルマン試薬(187)）を用いて，412 nmにおいてDTNBが発色しなくなる時点で反応終了とした。合成されたCoASAcの定量はクエン酸合成酵素が基質のオキサロ酢酸をクエン酸に変換する際にCoASAcが消費され，CoASHが生成される性質を利用し，生じたCoASHにDTNBを作用させ，412 nmにおいて発色定量した(187)。CoASHとDTNBとの反応の結果生じる発色化合物，5-チオ-2-ニトロ安息香酸の412 nmにおける吸光係数は $\epsilon_{412} = 13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である。

## 2-B. 測定機器

吸光スペクトル測定は日立製作所220型ダブルビーム型分光光度計，及び日立製作所U-2000型ダブルビーム型分光光度計を使用した。220型については循環水式の恒温装置，U-2000型についてはペルチエ式の電子制御恒温装置により測定中のセル内温度を一定に保った。蛍光スペクトル測定は日立製作所F-4010型蛍光分光光度計を用いた。CDスペクトル測定は日本分光のJ-600型（京都大学化学研究所・左右田教授所有）およびJ-720型旋光分散計を用いた。蛍光測定並びにCD測定については循環水式の恒温装置を用いてセル内温度を一定に保った。

## 2-C. 使用菌株ならびにプラスミド

トリプトファナーゼの大量発現株K-12MD55/pMD6Bは、当研究室の辻本氏により確立された(188)。この菌株は細胞内可溶性蛋白質の約60%に相当する量のトリプトファナーゼを発現する。

大腸菌由来シャペロニン蛋白質GroEL及びGroESは本研究により確立された大量発現株大腸菌DH-1/pKY206より精製した(152, 189)。DH-1株を形質転換する際に使用したプラスミドpKY206は京都大学ウイルス研究所の秋山芳展博士の作成した物をいただいた。本菌株は可溶性蛋白質の約50%に相当するGroEL蛋白質、GroES蛋白質を発現する。

大腸菌由来のPEPCは本研究室の寺田氏が確立した大量発現系、大腸菌F15/pT2より精製した。PEPCの欠失変異株である大腸菌F15株に大量発現プラスミドpT2を導入することにより得られた菌株で、PEPCを強く誘導する培地中で生育させると可溶性蛋白質の約30%に相当するPEPCを発現する。

なお、トリプトファナーゼの大量発現系K-12MD55/pMD6Bは染色体遺伝子に由来するテトラサイクリン耐性ならびにプラスミドに由来するアンピシリン耐性、GroEL・GroESの大量発現系DH-1/pKY206はプラスミドに由来するテトラサイクリン耐性、そしてPEPCの大量発現系F15/pT2は染色体遺伝子に由来するテトラサイクリン耐性及びプラスミドに由来するアンピシリン耐性を保持しているので、これらの菌の選択には各々の抗生物質耐性を利用している。

## 2-D. 細胞の培養

K-12MD55/pMD6Bの培養は本研究室にて確立された方法を用いた(189)。本培養を行う際にはトリプトファナーゼを誘導するために1g/lのL-トリプトファンを培地中に添加した。一晩の培養で1lの培地より約5gの菌体を得ることができる。

DH-1/pKY206の培養はすべてLB培地中で、以前報告した方法により行った(189)。5mlの前培養ならびに50mlの植え継ぎにおいては12.5  $\mu$ g/mlのテトラサイクリンを添加した。一晩の振とう培養により1lあたり約5.5gのDH-1/pKY206を得ることができる。

F15/pT2の培養はLB培地及びPEPC誘導用の合成培地を利用した。各々の培地の組成は以下に示した(190)。

## LB Medium (1lあたり)

酵母エキス	5 g
ポリペプトン	10 g
NaCl	5 g
D-Glucose	1 g
1N NaOHでpH 7.2 に調整	

## PEPC誘導培地 (1lあたり)

50 倍濃度 E - 培地 <sup>*1</sup>	20 ml
1% L-Methionine	10 ml
10% L-Arginine	2 ml
安楽の金属塩溶液 <sup>*2</sup>	1 ml
20% D-Glucose	50 ml

<sup>\*1</sup> [50 倍濃度 E - 培地] (1lあたり)

硫酸マグネシウム七水和物	10 g
クエン酸一水和物	100 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500 g
NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> 四水和物	175 g
1N NaOHでpH 7.2 に調整	

<sup>\*2</sup> [安楽の金属塩溶液] (1lあたり)

FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	480 mg	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	290 mg
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	280 mg	CoSO <sub>4</sub>	130 mg
CaCl <sub>2</sub>	270 mg		
ZnCl <sub>2</sub>	2000 mg		

培養方法はまず5 ml の LB 培地中にF15/pT2を白金耳で接種し、37℃で振とう培養により一晩培養する。培養された液を1 ml, LB 培地 50 ml に接種し、一晩振とう培養を行う。この培養液を10 ml とり2lの肩付きフラスコ中の1l PEPC誘導培地中に接種し、37℃で振とう培養する。1lあたり約4 g の菌体が存在する段階で集菌した。5 ml 及び50 ml の前培養においては50 µg/mlのアンピシリンを培地中に添加した。

## 2-E. 蛋白質の精製

トリプトファナーゼの精製はBehbahani-Nejadらの方法(191)を当研究室で改良した物を用いた。ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 分析及び比活性の測定により精製された試料を検定し、充分精製されていない標品が得られた場合には一連の精製手順の後に FPLC (Pharmacia) クロマトグラフィーシステムを用いて Superdex 200 HR 10/30 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて更に高度精製を行った。精製標品の比活性は30℃において約 51 U/mg, 25℃においては30.8 U/mg であった。

GroELならびに GroESの精製は申請者の修士学位論文において述べた方法を用いた



(189)。この方法で得られるGroEL及びGroESの純度が充分でない場合においては更に次の手順により精製した。まず、通常の方法で精製されたGroELとGroESの各試料をGroEL 14 量体及びGroES 7 量体が1 : 1 のモル比になるように緩衝液A中で混合し、この混合物に4 mM A T Pを加え1 0 分間放置した。

[緩衝液A]

50 mM Tris-HCl, pH 7.8  
0.1 M NaCl  
10 mM  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$   
0.5 mM DTT  
10 mM KCl

その後、0.5 mM A T Pを含む緩衝液Aで平衡化されたSuperdex 200 HR 10/30 カラムを用いてこのサンプルをゲル濾過クロマトグラフィーに供した。得られたGroEL・GroES複合体を含む画分を透析しヌクレオチドを取り除き、再びヌクレオチドを含まない緩衝液Aで平衡化されたSuperdexカラムでゲル濾過を行った。2 回目のゲルろ過カラムにより、GroELに結合したGroES 7 量体は解離し、GroELならびにGroESの高純度精製標品を得ることができる。この手順は更にGroELに結合している分子量の小さいペプチド断片をも分離する効果もあり、精製されたGroELは極めて高純度の精製標品となる。

PEPCの精製方法は当研究室の寺田氏らが開発した方法(192)を少々調節して用いた。簡潔に述べると、まず湿重量約1 0 gのF15/pT2菌体を緩衝液B 50 mlに懸濁し、0.3 mg/ml リゾチーム及び10 mM EDTA を添加した後、約1 時間氷中で攪拌した。この菌体懸濁液をごく短時間の超音波破碎処理（出力約100W, 1 0 秒間, 5 ~ 6 回）に供した後、約10,000 x gで遠心分離し、上清を粗酵素液とした。

[緩衝液B]

0.1 M Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$ , pH 7.4  
20 mM L- Aspartate  
0.5 mM DTT

この粗酵素液より核酸を取り除くために緩衝液Bに溶解した2 0 %ストレプトマイシン溶液を滴下し、最終濃度を2 %に調整した後、約3 0 分氷中で攪拌、その後約15,000

x g で遠心し上清を回収した。次に、上清に緩衝液 B の 100 % 飽和硫酸アンモニウム溶液を滴下することにより溶液中の硫酸アンモニウム濃度を 60 % にし、PEPC を沈殿させた。この沈殿を遠心分離により回収し、少量の緩衝液 C に溶解し一晚、緩衝液 C に対し透析した。透析後のサンプルを緩衝液 C で平衡化した Butyl-Toyopearl 650M 疎水性カラム（カラム体積 100 ml）に吸着させ、約 1 ベッド分の緩衝液 C で洗浄した後、硫酸アンモニウム濃度を 0.7 M に調整した緩衝液 C' で約 3 ベッド分、平衡化した。

#### [緩衝液 C]

0.1 M Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$ , pH 7.4

5 mM 2-Mercaptoethanol

1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ （緩衝液 C' については 0.7 M）

その後、10 mM L-アスパラギン酸を含む緩衝液 C' でカラム溶出を行うと PEPC が選択的にカラムより溶出される。溶出された PEPC の画分を硫酸アンモニウム及びアスパラギン酸を含まない緩衝液 C' に対して透析した後、粉末の硫酸アンモニウムを添加して 60 % 硫酸アンモニウム飽和溶液に調整し、PEPC を沈殿させ精製標品とした。精製された PEPC の 30 °C における比活性は約 130 U/mg であった。

#### 2-F. 蛋白質濃度定量法

トリプトファナーゼの濃度決定はホロ酵素（補酵素を結合した活性のある状態）及びアポ酵素について 278 nm における吸光係数が決定されているので、これらの定数を用いて分光学的に定量した（ホロ酵素： $A_{278\text{ nm}}^{1\%} = 8.87$ ；アポ酵素： $A_{278\text{ nm}}^{1\%} = 7.98$ ）。この値は当研究室において定量アミノ酸組成分析（Pico-Tag, Waters社）を行うことにより決定した。

GroEL の濃度決定もまた当研究室において求めた 277 nm における吸光係数を利用した（ $A_{277\text{ nm}}^{1\%} = 2.36$ ）。GroES の蛋白質濃度は Bradford の開発した比色検定法 (193) を利用した。実際の濃度決定は市販のキットを用いて行った（Bio-Rad Protein Assay Kit；日本バイオ・ラッドラボラトリーズ（株））。標準蛋白質試料としては既知の濃度の牛血清アルブミン（BSA）を利用した。

PEPC の濃度決定は当研究室において求めた PEPC の 281 nm における吸光係数を利用して行った（ $A_{281\text{ nm}}^{1\%} = 14.8$ ）。なお、吸光係数を用いて蛋白質濃度を決定する際に

は必ず光路長 1 cmのセルを利用して行った。

## 2-G. 活性測定法

トリプトファナーゼの活性測定は合成基質であるSOPCを用いて行った(194)。SOPCは370 nmにおいて強い吸収を持ち(吸光係数 $1.86 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )、トリプトファナーゼに分解されるとこの吸収が消失するので経時的に活性を測定することが可能である。活性測定溶液中のSOPCの濃度は0.33 mMに固定した。この濃度でのSOPCの非酵素的分解に由来する吸光度の変化は0.0272/minであるのでこの値を生吸光度変化より差し引いて活性を計算した。

PEPCの活性測定はPEPCの触媒する反応により化学量論的に生成されるオキサロ酢酸を供役酵素のMDHが更にリンゴ酸に変換する反応を利用し、MDHが作用する際に消費されるNADHの吸光度の減少を測定することにより行った(195)。NADHの340 nmにおける吸光係数は $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である。活性測定中の基質PEPの濃度は100 mMに設定した。なお、PEPCは様々なリガンドにより活性のアロステリック制御を受けるため、リガンド非存在下ではほとんど活性を示さない。従って、活性を測定する際には生理的活性化因子のCoASAcまたは非生理的活性化因子のジオキサン存在下で測定する。これらの活性化因子の詳しい濃度は以下の項において詳しく述べる。

以後の項においては、実験結果に沿ってトリプトファナーゼの自発的フォールディングに関する実験、トリプトファナーゼのGroE存在下におけるフォールディングに関する実験、GroEL自身の変性反応に関する実験、そしてGroE存在下におけるPEPCのフォールディングに関する実験のそれぞれの一連の手順としてまとめて記す。

## 2-H. トリプトファナーゼの自発的フォールディング反応に関する実験

### 2-H-1. トリプトファナーゼのアポ型・ホロ型・還元固定型酵素の作成

補酵素を結合したホロトリプトファナーゼよりPLPを取り除き、アポ型酵素を得る手順はMetzlerらの方法(196)を利用した。アポ化の手順は大きく3段階の透析に分けられ第一回の透析は0.5 M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 に対して、第二回の透析は0.1 M L-アラニンを含む同じ緩衝液に対して、そして最後の透析は0.1 M リン酸カリウム緩衝液、pH 7.8 に対して行うことにより、完全にPLPを取り除いたアポ型のトリプトファナーゼを得ることができた。アポ化の目安はPLPに由来する340 nmの吸



収が完全に消失する点を基準にした。逆にトリプトファナーゼをホロ化する場合に0.2 mM PLPを含む0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) 中に37℃で1時間おくことにより補酵素を充分結合したホロ型酵素を調製することができる。このホロ化されたサンプルをPD-10脱塩カラムに通すことにより余分のPLPを溶液中から取り除いた後、蛋白質濃度を決定し、一連の実験を行った。

ホロ型のトリプトファナーゼを水素化シアノホウ素ナトリウムで処理することによりPLPとトリプトファナーゼとの間に形成される Schiff 塩基を還元し、補酵素を不可逆的に固定することが可能である (還元固定型トリプトファナーゼ)。前述の手順でホロ化したトリプトファナーゼに対し、モル比で約800倍の水素化シアノホウ素ナトリウムを添加し、10分間反応させた。反応後、PD-10カラムで脱塩し、余分な試薬を取り除いた後に蛋白質濃度をホロトリプトファナーゼの吸光係数を用いて決定した。還元固定型トリプトファナーゼの吸光スペクトルはホロ酵素の持つ420 nm における Schiff 塩基由来の吸収が消失し、PLPのピリドキシル基に由来する340 nm の吸収を保持したままである。この340 nm付近の吸収を利用してトリプトファナーゼに還元固定された補酵素のモル数を定量したところ (ピリドキシルアミン5'-リン酸の  $\epsilon = 8,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 325 nm を利用した)、トリプトファナーゼの四量体あたり約3.4分子の補酵素が還元固定されたことが判明した。

## 2-H-2. トリプトファナーゼの変性反応

トリプトファナーゼの変性反応は励起波長 295 nm, 測定波長 340 nm 及び 500 nm における蛍光スペクトルの変化を以下の緩衝液中で観測した。

### [トリプトファナーゼ変性反応測定緩衝液]

0.1 M リン酸カリウム緩衝液, pH 7.8  
2 mM DTT  
2 mM EDTA

測定温度は25℃に設定した。実験手順は、濃度決定されたホロ型酵素のサンプルをあらかじめ計算された濃度のGdn-HClを含む緩衝液中に添加することにより変性反応を開始させた。この時試料中のトリプトファナーゼの濃度は10  $\mu\text{g/ml}$  になるように設定した。直ちに混合したサンプルの蛍光強度変化を340 nm および 500 nm において測定し

た（混合開始より測定開始までに要する時間：11 秒以上）。得られたデータは以下に示す擬一次反応速度式の理論式に当てはめて解析し、速度定数を求めた。

$$F(t)-F(\infty)=Ae^{-kt}$$

データ解析はアップル社製マッキントッシュコンピュータ上の解析ソフトIgor（WaveMetrics社）を用いて行った。

### 2-H-3. 変性トリプトファナーゼの自発的フォールディング実験

トリプトファナーゼの自発的フォールディング反応を観察するに当たっては、フォールディングを行う温度の様々な効果を調べるために大きく3種類の実験手順を用いている。それぞれの実験手順を以下にまとめた。なお、すべての自発的フォールディング反応はトリプトファナーゼフォールディング用緩衝液中で行う。また、構造形成反応中のトリプトファナーゼの濃度はすべての実験を通して5  $\mu$ g/mlに固定した。

#### 〔トリプトファナーゼフォールディング反応用緩衝液〕

50 mM HEPES-KOH, pH 7.8  
 10 mM  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$   
 50 mM KCl  
 2 mM DTT  
 0.06 mM PLP

#### 実験手順1：一定温度でのフォールディング（25℃）－

濃度の決定されたホロトリプトファナーゼのサンプルを等体積の8 M Gdn-HCl水溶液と混合して10 秒間穏やかに攪拌した後25℃で20 分放置する（完全変性トリプトファナーゼの調製）。この変性トリプトファナーゼ試料をあらかじめ25℃で温度を平衡化したフォールディング用緩衝液に希釈することによりGdn-HClの濃度を4 M から急激に低下させ、フォールディングを開始させる（希釈法によるフォールディング開始）。反応開始後、適時1 ml のサンプルを取り出し、0.33 mM SOPCを加え活性を25℃で測定した。各時点でのトリプトファナーゼの活性回復率は同じ条件で測定したネイティブ状態のトリプトファナーゼの比活性に対する割合として百分率で示した（Refolding Yield）。

#### 実験手順2：フォールディング反応開始温度の影響－

手順1において要約した様にトリプトファナーゼを変性させた後、様々な温度に

平衡化したフォールディング用緩衝液中に希釈し、フォールディング反応を開始させた。適時、1 ml サンプルをとり、25℃で活性を測定したが、構造形成中の温度が25℃ではないサンプルについては5分間25℃で温度を平衡化した後に活性を測定した。一定の時間フォールディングが進行した後にすべての試料を25℃の温浴に移し、続けて活性が回復する様子を測定した。

実験手順3：フォールディング反応を0℃で開始；直ちに37℃に昇温させフォールディング反応を行うー

手順1で述べたように変性させたトリプトファナーゼをあらかじめ氷中で温度を平衡化したフォールディング用緩衝液中に希釈することによりフォールディング反応を開始させた。反応開始後、一定時間0℃でフォールディングを行わせた後に37℃に昇温させ、1時間フォールディングを行わせた後に比活性を測定した。

## 2-1. シャペロニン存在下におけるトリプトファナーゼのフォールディング反応

### 2-1-1. フォールディング反応

シャペロニン存在下におけるトリプトファナーゼのフォールディング反応を行う際は、前述の方法で完全に変性させたトリプトファナーゼ試料をGroEL, GroES, 及びヌクレオチドを含むトリプトファナーゼフォールディング反应用緩衝液中に希釈することにより行った。実験によっては、シャペロニンの構成成分、またはヌクレオチドの種類を変化させてフォールディング反応を行った場合もある。フォールディング反応中に適時1 ml サンプルを取り出し、25℃で活性を測定した。フォールディング反応の活性回復率は前述の通り同条件におけるネイティブ状態のトリプトファナーゼの比活性に対する百分率で表した。なお、結果の章においてはGroEL 14 量体とGroES 7 量体をあわせた合計21 量体を“GroE”あるいは“GroE複合体”と表示する。また、反応溶液にGroELやGroESを添加する場合、GroEL, GroESの濃度を標的蛋白質の濃度に対する比で表している場合が多く、このような比は常に標的蛋白質のサブユニットモル濃度に対するGroEL 14 量体, GroES 7 量体, またはGroE 21 量体のオリゴマーモル濃度の比として表記するように統一する。

### 2-1-2. 構造形成中のアグリゲーションの測定ー蛍光散乱光測定

トリプトファナーゼの構造形成反応中に生じるアグリゲーションの量を定性的に測定するために、反応液中の試料溶液の光散乱強度を蛍光分光光度計を用いて励起波



長595 nm, 測定波長595 nm にて測定した。前項で述べたようなフォールディング反応溶液を作成し(全量1 ml), 反応開始後直ちに蛍光分光光度計で励起波長と同じ波長の蛍光強度を測定することにより, 入射光の光散乱強度を経時的に測定した。試料中のGroELの濃度を変化させ, GroELの濃度に依存したアグリゲーションの形成の様子を比較した。この際, GroELの添加量を変化させると絶対的な光散乱強度が大きく変化するため, データは相対光散乱強度, 即ちデータの外挿により求めた時間 0 における光散乱強度を生データのデータから差し引いた値で表示した。

### 2-1-3. GroELによるヌクレオチド加水分解量の測定-Lanzettaの比色検定法

フォールディング反応中にGroELが消費するATPなどのヌクレオチドの量を測定するために, 加水分解を伴う遊離リン酸の定量を比色検定法(197)により行った。比色検定に使用された試薬は以下の通り:

- A 溶液: 0.045 % マラカイトグリーンシュウ酸塩
- B 溶液: 4.2 % モリブデン酸アンモニウム 4 N HCl 溶液
- C 溶液: Triton X-100
- D 溶液: 34 % クエン酸三ナトリウム二水和物

発色試薬はA液, B液, C液を混合してその都度調製する。まずA液とB液を3:1の割合で混合し, 20分以上攪拌した後に混合液5 mlにつき5  $\mu$ lのC溶液を添加し攪拌後, Whatman No. 5 濾紙を用いて濾過した。定量を行うべきフォールディング反応溶液はフォールディング用緩衝液に10  $\mu$ g/mlの変性トリプトファナーゼ, 76  $\mu$ g/ml GroEL, 6.7  $\mu$ g/ml GroES, そしてヌクレオチドが添加され, 25  $^{\circ}$ Cで反応を進めた。適時50  $\mu$ lのサンプルを取り出し200  $\mu$ lの1 M過塩素酸と混合した後遠心し, 反応溶液中の蛋白質を除去した。この上清を50  $\mu$ lとり, 800  $\mu$ lの発色試薬とよく混ぜた後に100  $\mu$ lのD溶液と混合し約2時間放置した。その後, それぞれのサンプルについて660 nmにおける吸光度を測定し, 標準リン酸試料溶液を用いて作成した検量線を基準にして濃度を算出した。結果で示すデータはいわゆる非酵素的加水分解の寄与, 即ちトリプトファナーゼ存在下, GroEL非存在下のヌクレオチドの加水分解量を差し引いた物を記した。

## 2-I-4. トリプトファナーゼの再生反応を用いたヌクレオチドに対するGroELの親和性の測定

結果において詳しく述べるが、GroEL存在下におけるトリプトファナーゼのフォールディングは反応溶液中に存在するヌクレオチドの濃度に依存する。そこで、この濃度依存性を利用することにより、間接的に様々なヌクレオチドに対するGroELの親和性を調べる実験を行った。具体的には、前述したフォールディング反応溶液に添加するヌクレオチドの濃度を変化させ、150分間フォールディング反応を進行させた後、活性回復率を活性測定により定量した。得られた一連の活性回復率を規格化するためにそれぞれのデータを以下に示す式で処理し、比活性回復率を導いた。

$$[\text{比活性回復率}] = \{R(c) - R(0)\} / \{R(s) - R(0)\} \times 100 (\%)$$

この式で $R(c)$ はヌクレオチド濃度 $c$ におけるトリプトファナーゼの活性回復率、 $R(0)$ はヌクレオチド非存在下における活性回復率、そして $R(s)$ は飽和ヌクレオチド濃度(2 mM)におけるトリプトファナーゼの活性回復率を示す。

## 2-J. GroELの変性反応に関する実験

### 2-J-1. 蛍光スペクトル変化により観測するGroELの変性反応

GroELの変性に伴う蛍光スペクトル変化は以下の緩衝液中にて測定した。

#### [GroEL変性反应用緩衝液]

10 mM HEPES-KOH, pH 7.8  
 10 mM KCl  
 2.5 mM  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$   
 0.1 mM DTT

様々な濃度のGdn-HClを含む上記の緩衝液を3 ml のメスフラスコ中に調製し、50  $\mu\text{g/ml}$  のGroELを添加してメスアップすることによりGroEL濃度一定のサンプルを調製した。それぞれのサンプルを室温で約2時間放置した後、25℃において励起波長278 nm、測定波長278 nm (散乱強度) および308 nm (チロシン残基に由来する蛍光強度) の二波長において蛍光強度を測定した。得られたデータを規格化するため、最大強度と最

小強度の変化の幅を100とする百分率にそれぞれのデータを変換した。また、変性反応中の疎水性部位の露出の度合いを検証するために、上記のサンプルそれぞれに $2 \times 10^{-5}$  M ANSを加え、励起波長370 nm、測定波長485 nmにおいて測定した。この実験ではANSに由来する485 nm付近の蛍光強度が増加すれば分子表面に露出した疎水性部位が増加していることを示す。一通り測定したサンプルはその後24時間室温で放置した後に再び同じ測定を行い、調製2時間後に測定した際の結果と比較した。これは、GroELの変性反応溶液が充分平衡状態を保っていることを確認するために行った。

## 2-J-2. CDスペクトル変化によるGroELの変性反応の解析

蛍光スペクトル変化の他に、本研究ではGroELの変性反応中のCDスペクトル変化をも測定した。使用緩衝液は蛍光スペクトル変化を測定した際の緩衝液と同じ組成の物を利用した。試料調製法も蛍光スペクトルに関する実験と同じであり、資料作成後、測定が行われる前の平衡化時間が12時間である点においてのみ異なる。測定はポリペプチド鎖の二次構造形成に由来する吸収が強く現れる200 nm から250 nmにおける遠紫外領域において行い、特に $\alpha$ ヘリックス形成に由来する222 nmの吸収極大に注目し、様々なGdn-HCl濃度中でのこの波長のCDスペクトル変化を調べた。使用したセルの光路長は1 mm、得られたCDスペクトル強度を平均残基モル楕円率 $[\theta]$ （単位 $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ）に変換するために以下の式を利用した。

$$[\theta] = \frac{100 \times [\theta]_{\text{obs}}}{lc}$$

この式において、 $[\theta]_{\text{obs}}$ は観測されたCDスペクトル強度（単位deg）、 $l$ は観測を行ったセルの光路長（単位cm）、 $c$ は試料蛋白質の残基モル濃度（溶液中に存在するアミノ酸残基の総モル濃度；単位mol/l）である。 $c$ はGroELのサブユニット一個を分子量57,259の549残基からなるポリペプチド鎖として計算した。

## 2-J-3. GroELの熱安定性に関する実験：ATPアーゼ活性の測定

様々な温度におけるGroELの構造安定性を探るために、GroELの持つ弱いATPアーゼ活性を利用したGroELの熱安定性の実験を行った。GroELのATPアーゼ活性は非常に弱く、熱変性を探るための実験条件下では比色検定法は使用できないので、放射性ラベルされたAdenosine 5'- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  Triphosphate ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP)を利用した。実験方法はまず50  $\mu\text{g/ml}$ のGroEL試料溶液を以下の緩衝液を用いて調製した。



[GroEL A T P アーゼ活性測定用緩衝液]

50 mM HEPES-KOH, pH 7.8

50 mM KCl

10 mM  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$

0.5 mM DTT

GroEL試料溶液をサンプルチューブに分注し、50℃から80℃にかけての様々な温度で10分間熱処理を行った後に急冷して個々の熱処理試料を調製した。一方でA T P アーゼ活性を測定するために $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ A T P}$ （比活性約3000 Ci/mmol；アマシャム）をラベルされていないA T Pと混合することにより比活性を約0.05  $\mu\text{Ci/mmol}$ にし、この放射能活性を希釈された $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ A T P}$  10  $\mu\text{l}$ をGroELの熱処理サンプル（50  $\mu\text{l}$ ）に添加し（A T P濃度：約0.1 mM；GroEL濃度：41.7  $\mu\text{g/ml}$ ）1分間反応させた。反応を停止させるために40  $\mu\text{l}$ の100% TCA 溶液を添加し、生じた蛋白質性沈殿を遠心により取り除いた。この溶液の上清のうち50  $\mu\text{l}$ をエタノールと塩酸を用いた前処理により微粒子を取り除いた活性炭粉末懸濁液（250  $\mu\text{l}$ ）に添加した。活性炭粉末懸濁液は京都大学ウイルス研究所の重定 勝哉助教授にご指導いただいた方法で調製した。簡単に述べると、約30 gの活性炭粉末を300 mlの6 N HCl水溶液に懸濁し、一晚吸引、脱気した後に蒸留水で洗浄した。この処理は、活性炭の微粒子が溶液表面に浮遊することを防ぐ効果を持つ。その後、50%エタノール500 ml + 1.5 ml 濃アンモニア水に懸濁し、再び濾過しながら蒸留水で洗浄してできあがった活性炭のケーキを一晚、80℃で減圧乾燥し、最終的に0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液、pH6.0中の10%（重量パーセント）懸濁液として使用した。活性炭を反応液と混合することにより、未反応の放射性 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ A T P}$ が活性炭に吸着され、取り除かれる。遠心分離により活性炭を沈降させ、上清を150  $\mu\text{l}$ 取り出し、液体シンチレーション分析により遊離した放射性リン酸の定量を行った。データは1分間あたりにGroEL 1 サブユニットが加水分解するA T Pの分子数として表示した。

#### 2-J-4. GroELの変性に伴う四次構造変化に関する実験：ゲル濾過クロマトグラフィー分析

Gdn-HCl中のGroELの四次構造に関する情報を得るため、様々なGdn-HCl濃度中で

GroELをゲル濾過分析により観測した。使用した緩衝液は、様々な濃度のGdn-HClを含んだ以下の緩衝液である。

[GroELゲル濾過分析用緩衝液]

10 mM Tris-HCl, pH 7.8  
 10 mM  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$   
 200 mM KCl  
 $x$  M Gdn-HCl (サンプルによって変化)

50  $\mu\text{g/ml}$ のGroELを様々な濃度のGdn-HCl中に1時間放置し、変性反応を進行させた。あらかじめ同じ濃度のGdn-HClを含んだ緩衝液で平衡化したBio-Gel SEC 40-XL ゲル濾過カラムに一定量の試料を添加し、Gdn-HCl濃度増加に伴うGroELの溶出位置の変化を調べた。分子量の推定は既知の分子量の蛋白質数種を同じカラムで分析した際の溶出位置を元に検量線を作成し、推定した。分析はGilson社製のHPLCシステムを利用して行った(流速: 0.5 ml/min)。

## 2-J-5. GroELの変性反応の可逆性の確認

本研究で観測されたGroELの変性反応は複数の段階に分けられる複雑な物であり、そのうち可逆な段階も存在する可能性があったため、この反応の可逆性を調べるために実験を行った。高濃度(8.6 mg/ml)のGroEL試料溶液に8 M Gdn-HCl水溶液を加え、0.5 M Gdn-HClに調整した。この溶液を1時間25℃で放置した後GroELの変性反応用緩衝液に対し透析し変性剤を取り除いた。この処理を行ったGroELサンプルを用いて2-J-1で述べたような変性反応の実験を行い、通常の実験結果と比較した。なお、0.5 M Gdn-HCl中のGroELはアグリゲーションを形成することなく、透析膜からの蛋白質の回収率もほぼ100%であった。

## 2-K. シャペロニン存在下でのPEPCのフォールディング反応に関する実験

### 2-K-1. シャペロニン存在下のPEPCのフォールディング反応

GroE存在下でのPEPCのフォールディング反応は以下の緩衝液中で行った。

## [PEPCフォールディング反応用緩衝液]

100 mM HEPES-KOH, pH 7.0

10 mM  $\text{MgSO}_4$ 10 mM  $\text{KHCO}_3$ 

0.4 mM DTT

50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 

PEPCの濃縮試料を8 M Gdn-HCl 水溶液と混合することにより6 M Gdn-HCl に調製し、10 秒間穏やかに混合した後に1時間25℃で放置しPEPCを完全に変性させた。この変性したPEPC試料をGroEL, GroES, 及びATPを含んだ上記の緩衝液中で希釈することによってフォールディング反応を開始させた。フォールディング反応中のPEPCの濃度は25  $\mu\text{g/ml}$ であった。適時、100  $\mu\text{l}$ のサンプルを取り出し、800  $\mu\text{l}$ の緩衝液と混合した後に5分間25℃で放置した。この溶液に活性を測定するために必要な基質のPEP, 共役酵素のMDH, 補酵素NADH, 及び生理的活性剤のCoASAcを合計100  $\mu\text{l}$ 添加し、試料の全体積を1 mlにして340 nm において測定した（活性測定に要する各成分の濃度：PEP : 100 mM ; MDH : 1.5 IU ; NADH : 5 mM ; CoASAc : 0.33 mM）。活性測定はすべて25℃で行った。PEPCのフォールディング反応についてもトリプトファナーゼの自発的フォールディング反応と同様、フォールディング反応を行う温度を変化させて行うので、上に記した実験手順においてサンプル採取後、5分間25℃で放置するのは温度の異なるサンプルの平衡化を行うためである。データはトリプトファナーゼと同様、同じ条件で測定したネイティブ状態のPEPCの比活性に対する割合（百分率）で記した。

## 2-K-2. 構造形成中のアグリゲーションの測定：光散乱強度の測定

トリプトファナーゼと同様、PEPCの構造形成反応中に生じるアグリゲーションの量を蛍光分光光度計を用いて励起波長295 nm, 測定波長295 nm において観測した。2-K-1. に記した方法と同様の方法で蛍光測定用の試料を作成したが、PEPCの濃度を蛍光測定の場合は5  $\mu\text{g/ml}$ に設定した。これは活性測定と同じ濃度で光散乱強度を観測すると信号が飽和するためである。変性したPEPC試料を緩衝液に添加した後、すばやく攪拌して直ちに測定を開始した（測定開始までのデッドタイム：11秒）。すべてのデータはPEPCを添加する前の緩衝液（GroELが添加されている場合はGroELを含んだ緩衝液）の光散乱強度を差し引いて記した。



### § 3. 結果

#### 3-A. トリプトファナーゼの自発的変性・フォールディング反応

##### 3-A-1. トリプトファナーゼの蛍光スペクトル

図16に励起波長295 nmにおけるアポ、ホロ、及び変性したトリプトファナーゼの蛍光スペクトルを記した。トリプトファナーゼはアミノ酸配列内に2個のトリプトファン残基を持ち、その二残基のトリプトファンがトリプトファナーゼの蛍光スペクトルに大きく寄与している（三種のスペクトルにおいて共通にみられる330 nm から350 nm 付近のピーク）。また、このうちTrp-248は活性部位に結合するPLPの近傍にあることが知られており、ネイティブ状態のホロトリプトファナーゼにおいてはTrp-248が光を吸収し蛍光を発するとこのエネルギーがPLPの分子軌道を更に励起し、PLP由来の蛍光が生じる蛍光のエネルギー移動と呼ばれる現象が観測される(198)。このエネルギー移動に由来する蛍光はホロトリプトファナーゼの蛍光スペクトルにおいて500 nm 付近に現れている。蛍光のエネルギー移動は、エネルギーの受け渡しをする2個の発色団の空間的距離や配向に非常に敏感な現象であるため、しばしば蛋白質の立体構造の微小な変化を検出するために利用される。本研究においても、ホロトリプトファナーゼの変性反応を解析するに当たって、スペクトルの主要なピークにあたる

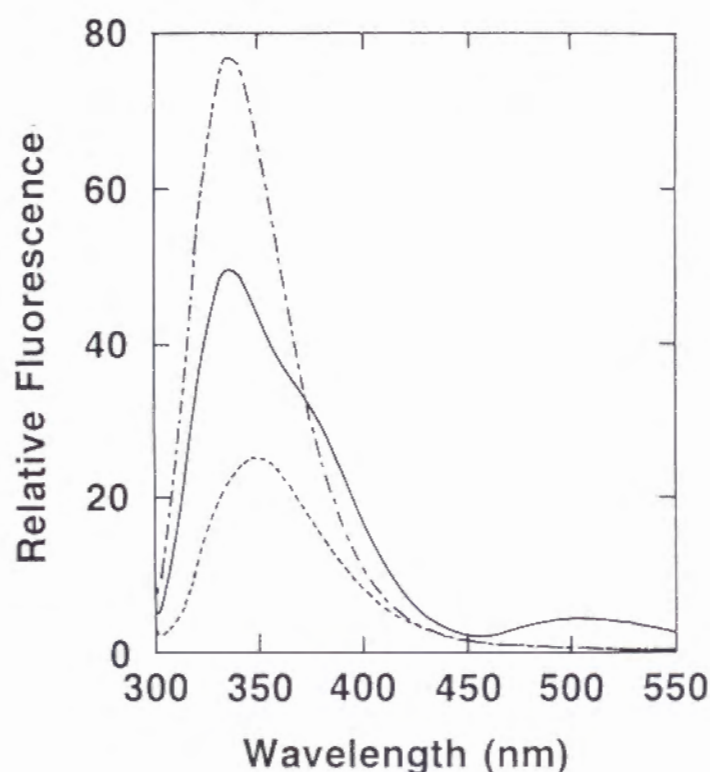


図16. トリプトファナーゼのネイティブ状態におけるアポ及びホロ構造、ならびに3.5 M Gdn-HCl中で変性した構造の蛍光スペクトル。すべてのスペクトルは2 mM DTT および 2 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液、pH7.8 中で測定した。蛍光の励起波長は295 nm、温度は25℃である。トリプトファナーゼの濃度は50  $\mu$ g/mlに統一した。実線、ネイティブ状態のホロトリプトファナーゼ；点破線、ネイティブ状態のアポトリプトファナーゼ；点線、3.5 M Gdn-HCl中のトリプトファナーゼ。

340 nm 付近の蛍光強度変化を観測すると共に、500 nm 付近のエネルギー移動に由来する蛍光スペクトルの変化の様子も併せて観測した。

### 3-A-2. トリプトファナーゼの変性反応—蛍光スペクトル変化による解析

本研究は当初、トリプトファナーゼの変性反応について序論で述べたような熱力学的解析と速度論的解析を併せて行う予定であった。しかし、幾つかの予備実験を行った結果、トリプトファナーゼは蛍光スペクトル分析で検出可能な限界の濃度 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) においても 1.0 M から 1.6 M Gdn-HCl 中でアグリゲーションを形成することが明らかとなった。試料中にアグリゲーションが生じると直接変性反応に関与している蛋白質分子の濃度が試料によって変動してしまい、系が熱力学的な平衡状態を保てず、自由エネルギー変化に関する解析が行えなくなる。従ってトリプトファナーゼの変性反応に関する知見は専ら速度論的解析より得た。

図 17 にトリプトファナーゼを低濃度、中程度の濃度、そして高濃度の Gdn-HCl 中で変性させた場合の 340 nm および 500 nm における蛍光スペクトル変化の代表例を示した。1.0 M Gdn-HCl 以下の低濃度の Gdn-HCl 中では、トリプトファナーゼは図 17 の(a)でみられるような緩やかな蛍光の上昇を 340 nm において見せた。ほぼ同じ速度で、500 nm の蛍光強度が減少しているのが観測された。500 nm における蛍光強度の変化により、このような低濃度の Gdn-HCl 中では Trp-248 と補酵素 P L P の環境において何らかの変化が生じていることが考えられたので、これを検証するための実験を行った。P L P はホロ状態においてトリプトファナーゼのアミノ酸配列内のリジン残基と共有結合を形成するが、このシッフ塩基と呼ばれる特徴的な結合は 420 nm において固有の光の吸収帯を持つ。そこで低 Gdn-HCl 濃度におけるトリプトファナーゼの 420 nm の吸収スペクトルの変化を測定した。その結果、420 nm における吸収は蛍光スペクトル変化とほぼ同じ速度で減少していることが明らかとなった。次に、この変性過程の可逆性を調べるために、低 Gdn-HCl 濃度中に一定時間放置し、上述の蛍光スペクトルの変化が終了した段階でフォールディング用緩衝液中に希釈することにより構造形成反応を開始させ、再び活性を持つホロトリプトファナーゼが形成されないか、確認した。図 17 (a)にみられるように 0.7 M Gdn-HCl 中では 340 nm における蛍光の上昇は約 15 分で完了しているため、この実験ではトリプトファナーゼの試料を 15 分間 0.7 M Gdn-HCl 中で変性させた後、30 分間 37℃で構造形成させた後の比活性を測定した。その結果、トリプトファナーゼの活性回復率は 90%以上となり、0.7 M

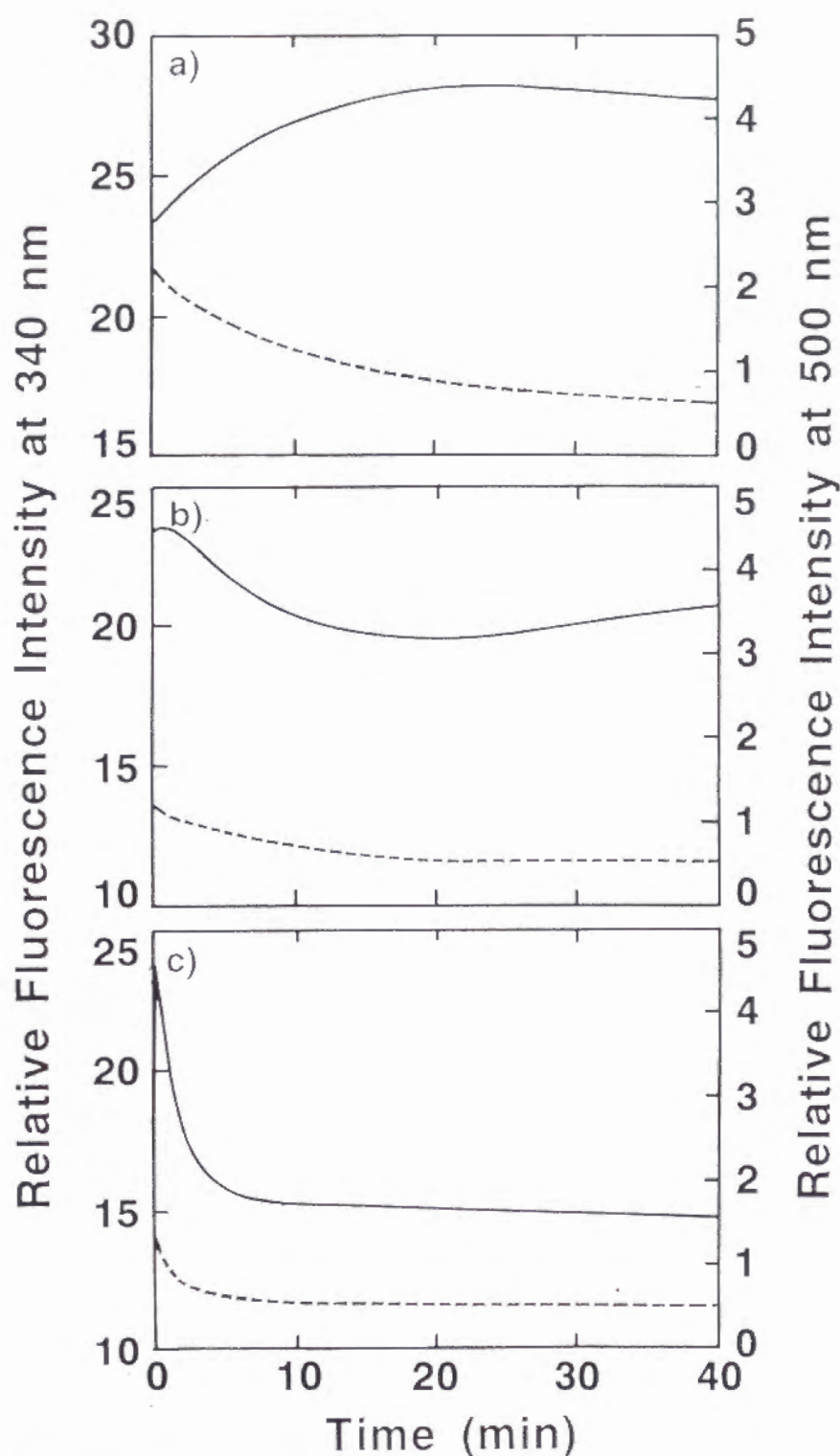


図 17. 様々な濃度のGdn-HCl中におけるホロトリプトファナーゼの340 nm, ならびに500 nmにおける蛍光強度の変化。(a)は0.7 M Gdn-HCl中のホロトリプトファナーゼの蛍光スペクトル変化, (b)は1.4 M Gdn-HCl中の蛍光スペクトル変化, (c)は2.0 M Gdn-HCl中の蛍光スペクトル変化を表す。各図において実線は340 nmにおける蛍光強度の変化を表し(図左の目盛り), 破線は500 nmにおける蛍光強度の変化を示す(図右の目盛り)。トリプトファナーゼの濃度は10  $\mu$ g/ml, 測定温度は25℃であった。変性反応はあらかじめ計算された濃度のGdn-HClを含むトリプトファナーゼ変性反应用緩衝液中にトリプトファナーゼの試料を添加し, すばやく混合して直ちに測定することにより行った。



Gdn-HCl 中でみられる変性反応はほぼ可逆な反応であることが明らかとなった。また、同様の反応がアポトリプトファナーゼについても観測されるかどうかを確認するために、同じ条件でアポトリプトファナーゼを変性させたところ、アポトリプトファナーゼは340 nm においてこのような蛍光の上昇を見せなかった。

図17(b)に1.0 M から 1.6 M Gdn-HCl の中程度の変性剤濃度領域を代表する1.4 M Gdn-HCl 中のホトリプトファナーゼの蛍光スペクトル変化を示した。この濃度領域の340 nm における蛍光スペクトルの変化は極めて複雑で、まず測定開始後約3分間蛍光強度が上昇した後、その後約20分間にわたって蛍光が減少し、測定開始後約25分の時点より再び蛍光強度が上昇するという、合計3成分のスペクトル変化がみられた。最初の蛍光の上昇は低濃度のGdn-HCl 中でもみられたPLP結合部位近傍の構造変化に由来する蛍光の上昇であり、その次の蛍光の減少はトリプトファナーゼ分子の大規模な変性のためにトリプトファン残基が親水的な環境に移行し、蛍光強度が低下したと考えられる。問題は最後の蛍光の上昇であったが、同じ変性反応を励起波長、測定波長を共に295 nmに設定し、散乱光を測定したところ、図18にみられるように実験開始後約25分の段階で急激な散乱光の上昇、即ちアグリゲーションの形成が観測された。従って、図17(b)でみられる最後の蛍光強度の上昇はトリプトファナーゼの変性中間体がアグリゲーションを形成した結果、溶液の光散乱強度が上昇したために観測されたと思われる。

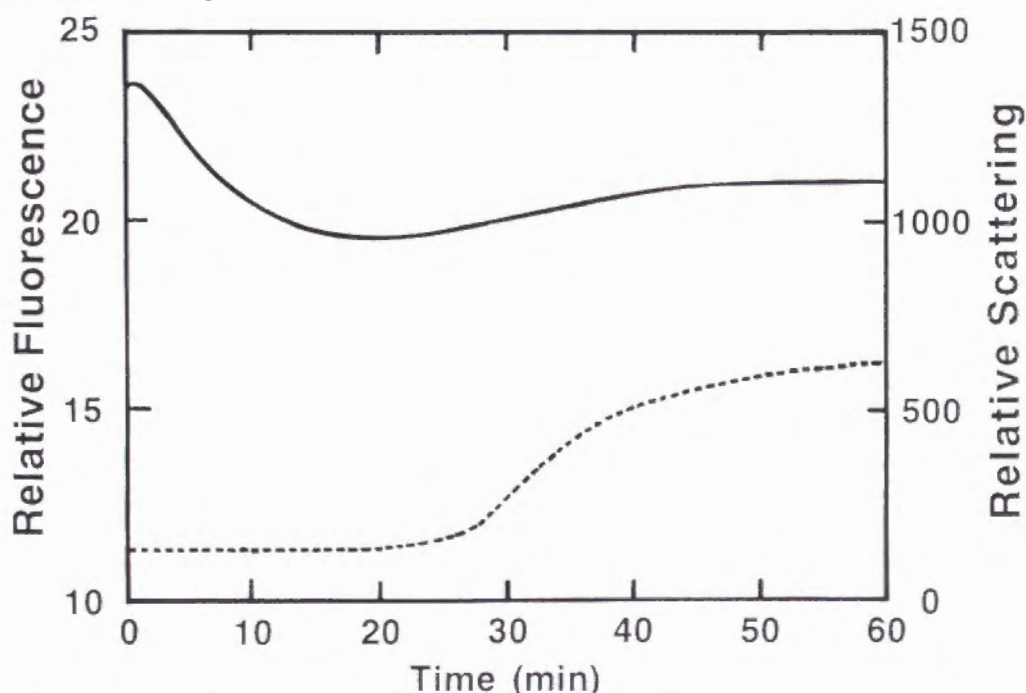


図18. 1.4 M Gdn-HCl 中でホトリプトファナーゼを変性させた場合の340 nm における蛍光強度変化と295 nm における光散乱強度の変化。実験手順は図17の実験と同一である。実線は340 nm における蛍光強度の変化、点線は295 nm における光散乱強度の変化である。

図 1 7(c)には1.6 M Gdn-HCl 以上の高濃度における実験を代表する, 2.0 M Gdn-HCl中におけるホトリプトファナーゼの蛍光スペクトル変化を示した。高濃度のGdn-HCl存在下ではトリプトファナーゼは340 nm において単調な蛍光強度の減少を見せた。2.5 M 以上の高いGdn-HCl 存在下では蛍光の変化は試料調製中に完了してしまい, 測定が不可能であった。500 nm における蛍光の変化は, 低濃度でみられた現象とは異なり, 340 nm における蛍光の減少する速度とほぼ同じ速度で進むのが観測された。

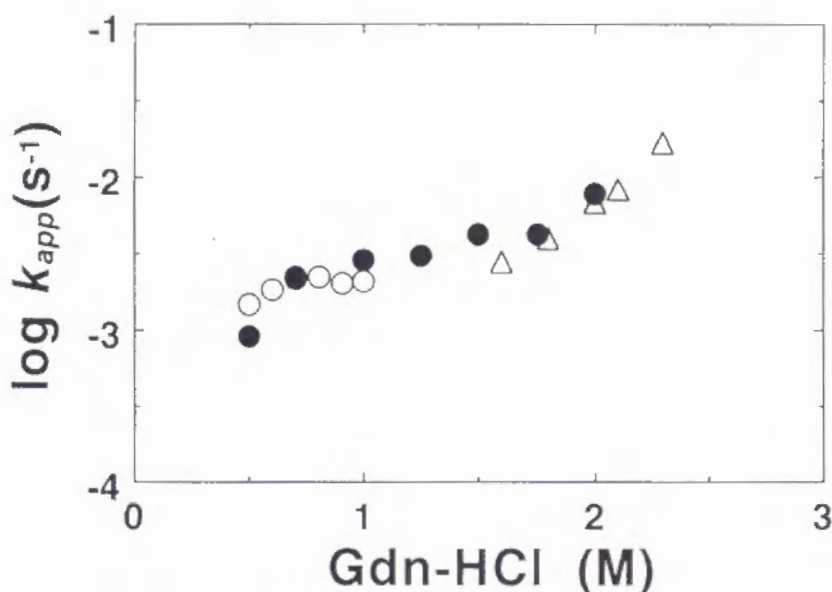


図 1 9. 様々なGdn-HCl濃度中におけるホトリプトファナーゼの蛍光強度の変化を解析した結果。各々のGdn-HCl濃度中でトリプトファナーゼの蛍光スペクトルの変化を測定し, 観測された成分の中で最も強度変化の大きい成分について擬一次反応速度式により解析した。○, 1 M Gdn-HCl 以下で観測される340 nm における蛍光強度の上昇(図 1 7(a)参照); ●, 500 nm における蛍光の減少; △, 1.6 M Gdn-HCl 以上の濃度で観測される蛍光の減少。実験手順は図 1 7 に示した結果と同一のものを使用した。

以上の結果をより詳細に評価するために, 様々なGdn-HCl濃度におけるトリプトファナーゼの蛍光スペクトル変化のうち, 最も大きい蛍光強度の変化を見せた相を擬一次反応速度式により解析して得た反応速度定数をまとめたものを図 1 9 に示した。図に示したとおり, 低濃度のGdn-HCl 中では500 nm における蛍光強度の変化は340 nm における蛍光の上昇, 即ち, P L P 脱離に由来する蛍光の変化を反映していることがわかる。中間領域においてはアグリゲーション形成のため, 340 nm における蛍光強度の変化は信頼度の高い解析が行えなかったので表示しなかったが, 500 nm における蛍光強度変化の速度定数は緩やかに増加していることが明らかとなった。一方, 高濃度の变性剤中では500 nm における蛍光強度の変化は340 nm における蛍光強度の減少, 即ち

トリプトファナーゼの大規模な変性とはほぼ同じ速度で補酵素 P L P と Trp-248 の近傍の構造が変化していると思われる。

### 3-A-3. トリプトファナーゼの構造安定性—補酵素結合の寄与

前項に示した一連の実験でトリプトファナーゼの変性反応には補酵素の P L P が非常に密接に関与していることが明らかとなったので、P L P が結合することによりトリプトファナーゼの立体構造にどのような影響が及ぼされるかを調べた。トリプトファナーゼは補酵素の結合様式に従って3種類、即ちアポ構造、ホロ構造、そして P L P が不可逆的に結合した還元固定型の構造を形成させることができる。このそれぞれの構造を持ったトリプトファナーゼを Gdn-HCl 中で変性させ、その蛍光スペクトルが変化する様子を測定した結果を図 20 にまとめた。これまでも他の研究者によりトリプトファナーゼは補酵素を結合したホロ構造がアポ構造よりも安定であることが報告されており(199, 200)、今回の実験においてもこの結果は確認された。興味深いのは還元固定されたトリプトファナーゼに関する結果であり、還元固定型トリプトファナーゼは Gdn-HCl 中でホロトリプトファナーゼよりも更に安定であることが明らかとなった。

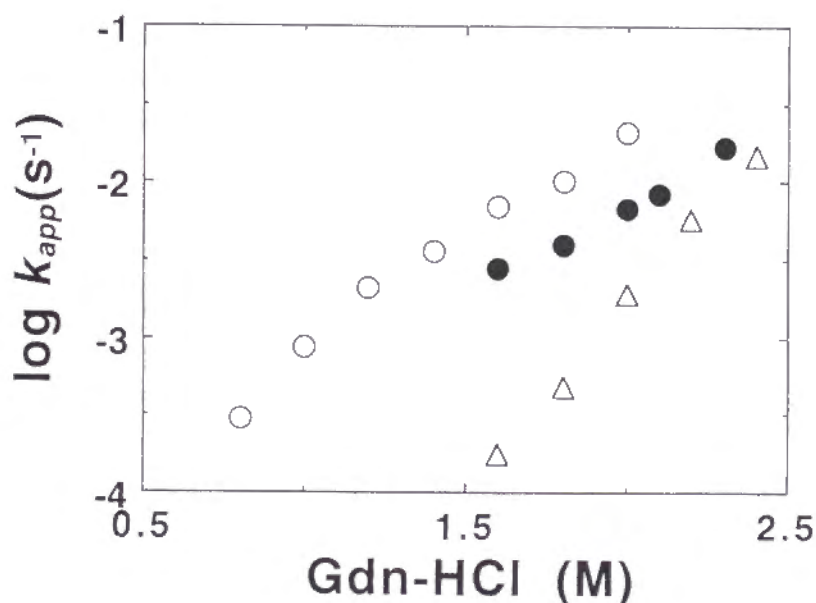


図 20. 様々な Gdn-HCl 濃度中におけるアポ、ホロ、還元固定型トリプトファナーゼの 340 nm における蛍光強度スペクトル変化の解析。励起波長は 295 nm。あらかじめ調製された 3 種のトリプトファナーゼをそれぞれの濃度の Gdn-HCl を含んだ緩衝液中に添加し、340 nm における蛍光強度の減少を観測した。得られた結果を擬一次反応速度式に従って解析し、得られた反応速度定数を示した。実験温度は 25 °C、実験中のトリプトファナーゼの濃度は 10  $\mu$ g/ml である。○, アポトリプトファナーゼ; ●, ホロトリプトファナーゼ; △, 還元固定型トリプトファナーゼ。



### 3-A-4. トリプトファナーゼの自発的フォールディング反応

トリプトファナーゼの変性反応の逆反応に当たるフォールディング反応を観測するために4 M Gdn-HCl中で完全に変性させたトリプトファナーゼを希釈法により構造形成させ、その構造を形成する様子を活性測定法により調べた。ところが、トリプトファナーゼは反応液中の極めて希薄な蛋白質濃度条件下 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) においても顕著なアグリゲーション形成の傾向を示し、最終的な活性回復率は約15%にとどまるという結果が得られた。このような低い活性回復率ではトリプトファナーゼのフォールディング反応に関する詳細な研究は不可能であったため、この活性回復率を改良する実験条件を模索した。特に、アグリゲーション形成に分子表面の疎水性領域が密接に関係していることに注目し、疎水性相互作用を抑制するような条件を重点的に試行した。一連の実験を行っている最中に見えフォールディング反応となんら関係のない様に思われる、使用している変性したホロトリプトファナーゼ試料の濃度とサンプルの最終的な活性回復率との間に不思議な相関関係があることを見いだした。

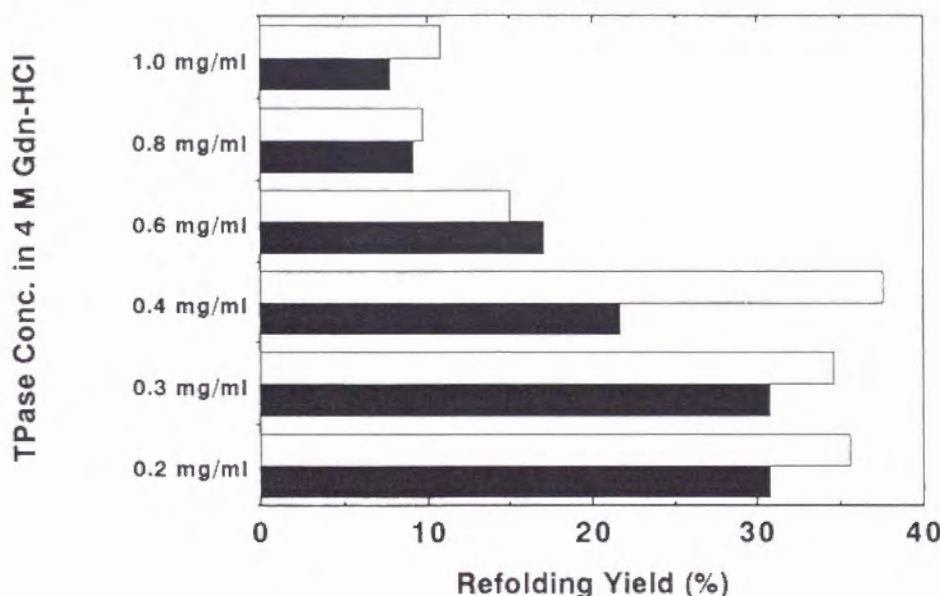


図21. トリプトファナーゼの自発的フォールディング反応における活性回復率と変性条件下でのトリプトファナーゼの濃度の関係。あらかじめ0.4 mg/mlから2.0 mg/mlに調整したトリプトファナーゼの溶液を等体積の8 M Gdn-HCl水溶液と混合し、攪拌することによりトリプトファナーゼの濃度が異なる変性試料を調製した（調製した試料のトリプトファナーゼ濃度は図の縦軸に示した）。25℃に温度平衡化した緩衝液中にこれらの変性試料を添加し、すばやく攪拌することによりフォールディング反応を開始させた。この際、トリプトファナーゼの濃度は $5 \mu\text{g/ml}$ に統一した。25℃でフォールディング反応を1時間進行させた後、活性を測定した。図中の白いバーで示した結果は、希釈率の違いによりフォールディング反応中の残留Gdn-HCl濃度がサンプル間で異なった場合の結果である。それぞれのサンプルの残留Gdn-HCl濃度は以下の通り：1.0 mg/ml, 20 mM；0.8 mg/ml, 25 mM；0.6 mg/ml, 33.3 mM；0.4 mg/ml, 50 mM；0.2 mg/ml, 100 mM。図中の黒いバーで示した結果は、あらかじめフォールディング用緩衝液にGdn-HClを添加しておき、構造形成中の残留Gdn-HCl濃度を100 mMに統一したサンプルについての結果である。“Refolding Yield”：活性回復率。

図21に示した棒グラフには、0.4 mg/ml から 2.0 mg/ml までの様々な濃度のホトリプトファナーゼ溶液を調製し、それぞれの溶液を等量の 8 M Gdn-HCl 水溶液と混合した後、その一部をフォールディング用緩衝液に希釈して（トリプトファナーゼ濃度：5  $\mu$ g/ml）構造を形成させた際の最終的な活性回復率を示した。まず図中の白いバーで示した実験においては、トリプトファナーゼのフォールディング反応は実験に使用する変性トリプトファナーゼ試料の濃度が希薄であればあるほど活性回復率がよく、最大約2倍の活性回復率の差が観測されることが明らかとなった。このように直接フォールディング反応とは関係のない実験手順が最終的な活性回復率に著しい影響を与える理由として、最初はフォールディング反応液中に混入される微量のGdn-HClが関係しているのではないかと考えられた。実験手順上、変性状態におけるトリプトファナーゼの濃度は異なり、構造形成中のトリプトファナーゼの濃度は5  $\mu$ g/mlに統一されているため、トリプトファナーゼの濃度が低いサンプルほど変性剤の希釈率が低く、フォールディング反応液中により高濃度のGdn-HClが持ち越されることになるので、Gdn-HClがアグリゲーションを抑制する効果を発現していると考えれば実験結果を説明できた。ところが、この仮説を検証するために同じ図の黒いバーで示したように、あらかじめ計算された量のGdn-HCl水溶液をフォールディング用緩衝液に添加して

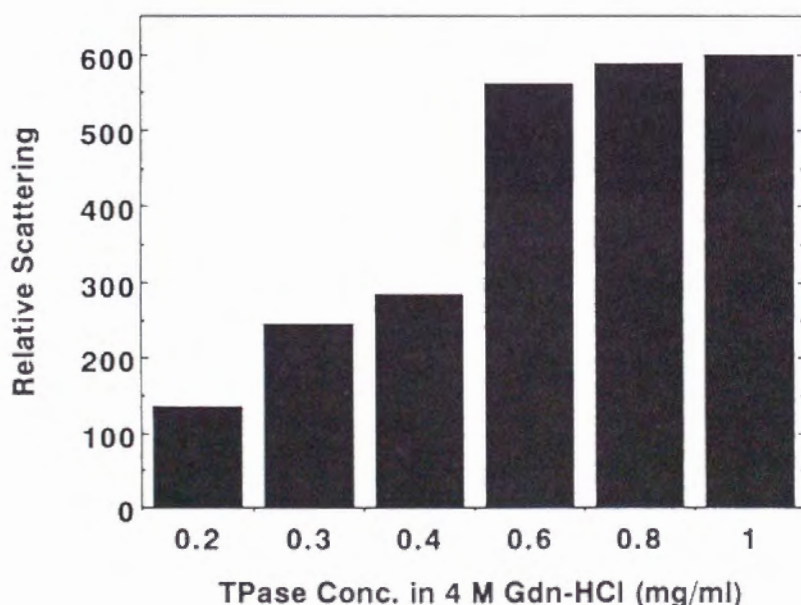


図22. トリプトファナーゼの自発的フォールディング反応中のアグリゲーション形成の様子。図21に示した実験と同じ方法により、変性中の濃度を変化させたトリプトファナーゼ試料を用いてフォールディング反応を行い、フォールディング反応中に形成されるアグリゲーションの度合いを295 nmにおいて経時的に測定した。図に示した値はフォールディング反応開始から2000秒が経過した後の295 nmにおける光散乱強度を示す。構造形成中のトリプトファナーゼの濃度は5  $\mu$ g/ml、残留Gdn-HCl濃度は100 mMに統一した。



おくことにより構造形成反応液中のGdn-HCl濃度を統一して同じ実験を行ってもほぼ同様の結果が得られた。この実験により、実験に使用するトリプトファナーゼ試料の濃度とフォールディング反応の活性回復率に何らかの因果関係が存在することが解明された。更に変性トリプトファナーゼ試料の濃度とアグリゲーションの量との関係を直接確認するために、図21の黒いバーで示した実験と同じ方法でフォールディング反応を行い、構造形成中に形成されるアグリゲーションを光散乱強度測定により観測した。図22に示したようにやはり実験に使用する変性トリプトファナーゼ試料の濃度が低いほど構造形成中のアグリゲーションも抑制されることが明らかとなった。なお、結果には示さなかったが、フォールディング反応中に形成されるこのアグリゲーションは反応開始直後、即ち変性したトリプトファナーゼを緩衝液に添加し、攪拌している段階にて大部分が形成されていた。

トリプトファナーゼのフォールディング反応における温度の効果も調べた結果、興味深い実験結果を得た。図23にはフォールディング反応を様々な実験温度で行った場合のトリプトファナーゼの活性回復の様子を示した。図に示した実験ではフォールディング開始後2時間の段階ですべての試料を25℃の高温槽に移動させ、その後のフォールディング反応を25℃で行った。図に示したように、トリプトファナーゼのフォールディング反応は20℃から25℃付近において最も高い活性回復率を示した。この温度領域より高い37℃で構造形成させた試料や、低い10℃で構造形成させた試料は共に低い活性回復率しか示さなかった。ところが、実験中にサンプルの温度を25℃に移動させると10℃で構造形成させたトリプトファナーゼは急激な活性の回復を見せ、最終的には20℃で観測された活性回復率に近い活性回復率を示した。一方で、37℃で構造形成させた試料については25℃にサンプルの温度を下げても、活性回復率に影響はなかった。これら一連のフォールディング反応に関する実験にもとづいて、トリプトファナーゼのフォールディング反応初期に温度に非常に敏感な過程が存在し、この過程はアグリゲーション形成と関連していると考察した。そこで、反応初期に形成されるであろうアグリゲーションを制限するため、材料と方法に述べた第3の実験手順、即ちフォールディング反応を氷上（0℃）で開始させ、直ちに37℃に昇温させた後、1時間37℃で反応を進行させると、37℃においてトリプトファナーゼは27 U/mgの活性を示した。これはフォールディング反応を一貫して37℃で行った場合の最終的な活性回復率の約7倍の値であった（3.7 U/mg, 37℃で測定）。



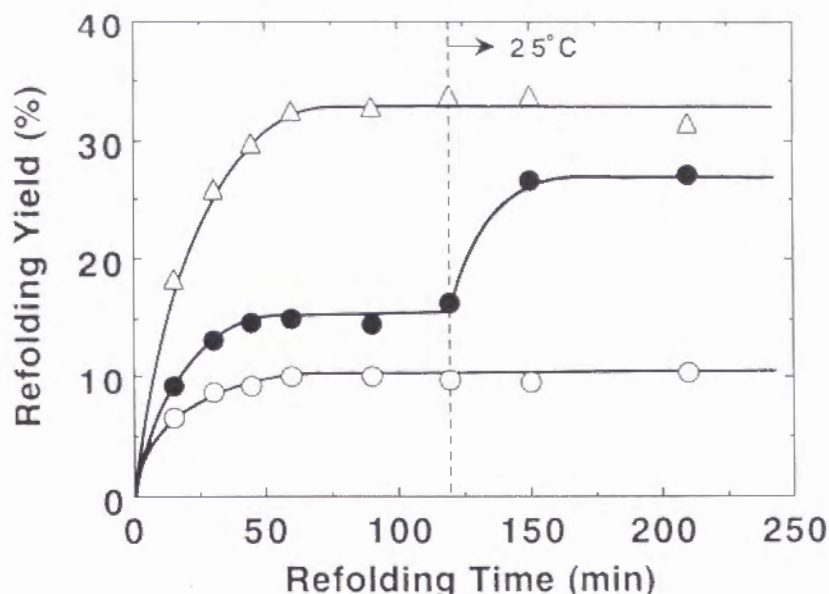


図 2.3. トリプトファナーゼの自発的フォールディング反応における温度の効果。様々な温度に平衡化したフォールディング反応緩衝液に変性させたトリプトファナーゼを添加し、フォールディング反応を行った。実験開始後2時間の段階ですべてのサンプルを25℃の恒温槽に移動させ、フォールディングを続けた。反応中、適時サンプルをとり、活性を測定した。変性中のトリプトファナーゼの濃度は0.2 mg/ml, 構造形成中のトリプトファナーゼの濃度は5  $\mu$ g/ml, 残留Gdn-HCl濃度は100 mMに統一した。○, 37℃; ●, 10℃; △, 20℃。図中“Refolding Time”は反応溶液中に変性トリプトファナーゼを添加した時点からの経過時間, “Refolding Yield”はネイティブ酵素を同条件で測定した際の比活性に対するサンプルの比活性の割合(百分率)であり、以後の実験に関しても同様に表記する。

### 3-B. シャペロニン存在下でのトリプトファナーゼのフォールディング反応

#### 3-B-1. 活性測定によるフォールディング反応の解析

トリプトファナーゼのフォールディング反応を更に効率よくするために、フォールディング反応溶液中にアグリゲーションを抑制する効果を持つことが報告されている様々な因子を添加し、トリプトファナーゼのフォールディング反応の変化を活性測定により観測した。なお、この実験においては、前項において明らかにしたトリプトファナーゼのフォールディング温度、並びに変性トリプトファナーゼ試料の濃度と活性回復率の関係は考慮していないので、トリプトファナーゼの自発的な活性回復率はこれらの因子の影響が明らかになる前の値、即ち15%とされている。牛血清アルブミンは様々な蛋白質のネイティブ状態を安定化することが報告されており(43), ポリエチレングリコール4000 (PEG)は炭酸脱水酵素B型のフォールディング反応を補助することが報告されているので(201), これら二つの因子を添加した際のトリプトファナーゼのフォールディング反応の様子、ならびに生体内において蛋白質のフォール

ディング反応を補助することが報告されていたシャペロニンGroE存在下でのトリプトファナーゼの活性回復の様子を観測した。図24に示したように、牛血清アルブミン存在下でトリプトファナーゼを構造形成させた場合、ごくわずかな活性回復率の向上が観測された。一方、PEG存在下で構造形成させたトリプトファナーゼはむしろ自発的なフォールディング反応よりも低い活性回復率が観測された。最も顕著な効果を示したのがシャペロニンGroEであり、トリプトファナーゼのサブユニットに対し5倍量のシャペロニン存在下でトリプトファナーゼの活性回復率は45%、15倍量のシャペロニン存在下で最大80%の活性回復率がみられた。トリプトファナーゼのフォールディング反応もやはり大腸菌由来のシャペロニン蛋白質GroEに補助されうる事がこの実験より明らかとなった。

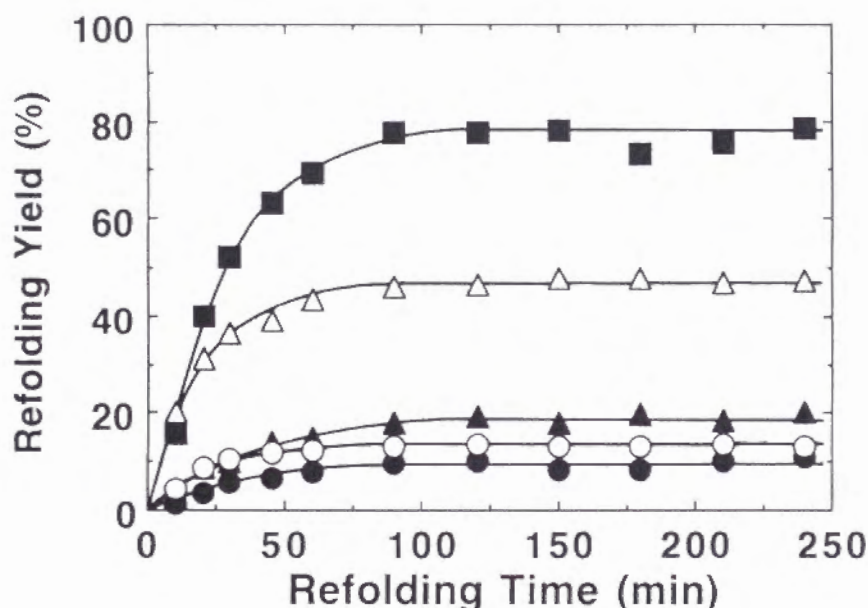


図24. 様々な補助因子存在下でのトリプトファナーゼのフォールディング反応。実験温度は25℃。トリプトファナーゼを4 M Gdn-HCl中で変性させた後、蛋白質のフォールディングを補助することが知られている因子を添加したトリプトファナーゼフォールディング反応緩衝液中に希釈し、フォールディングの様子を活性で測定した。反応溶液中のトリプトファナーゼの濃度は5  $\mu$ g/ml、変性中のトリプトファナーゼの濃度はこの実験では0.8 mg/mlであった。従って、この実験におけるトリプトファナーゼの自発的なフォールディング反応の活性回復率(○)は15%となっている(図21参照)。○, トリプトファナーゼの自発的なフォールディング; ●, 10 mg/ml PEG存在下でのフォールディング; ▲, 1.0 mg/ml BSA存在下でのフォールディング; △, トリプトファナーゼサブユニットモル濃度に対し5倍量のGroEL, GroES, ならびに2 mM ATP存在下でのフォールディング; ■, トリプトファナーゼに対し15倍量のGroEL, GroES, ならびに2 mM ATP存在下でのフォールディング。

図24の実験結果を受け、トリプトファナーゼのフォールディング反応におけるGroEの効果をより詳細に調べるために、まずGroEがトリプトファナーゼのフォールディング反応を補助する効果を発現するのに最適なGroEとトリプトファナーゼの量比を調べた。図25に示した実験では、様々な濃度のGroE存在下でトリプトファナーゼのフォールディングを2時間行わせ、得られた最終的な活性回復率を調べた。トリプトファナーゼのフォールディング反応に対するGroEの効果は予想されたようにGroEの濃度に強く依存し、トリプトファナーゼのサブユニットに対し1.5倍量のGroEオリゴマーが存在する反応液中で最も強い効果を示すことが明らかとなった。

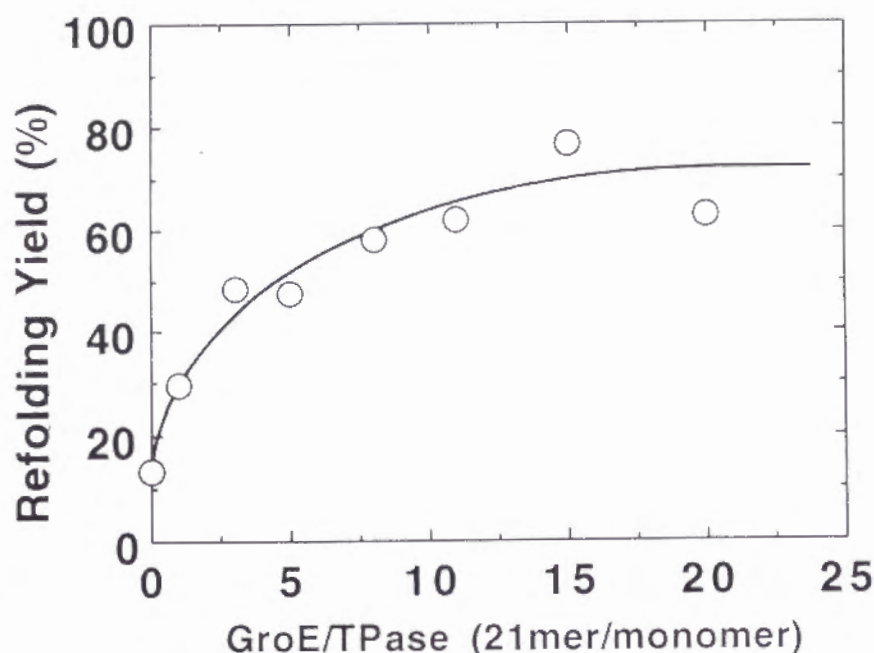


図25. トリプトファナーゼの活性回復率とトリプトファナーゼ：GroE複合体量比の関係。反応溶液中のGroEL、GroESの濃度を変化させ、図24に示した実験と同一の方法で構造を形成させた。フォールディング開始後2時間の時点でサンプルをとり、活性回復率を測定した。横軸にはGroEL、GroESの合計21量体のオリゴマーモル濃度と、トリプトファナーゼのサブユニットモル濃度との割合を示す。

次に、“GroE”と総称しているGroEL・GroES・そしてヌクレオチドATPという、複合体を形成する因子の各々の役割を解明するため、それぞれの因子を選択的に実験系から取り除いた反応溶液中でトリプトファナーゼが活性を回復する様子を観察した。図26(a)に示したように、フォールディング反応液よりGroELを除いた場合、トリプトファナーゼの活性回復率は自発的フォールディング反応のそれとほとんど変わらなかった。一方、GroESを反応系から取り除いても、得られた活性回復率は完全なGroE複合体存在下での活性回復率とほとんど変わらなかった(図26(b))。そしてATP非存在下ではトリプトファナーゼの活性回復は自発的なフォールディングの場合



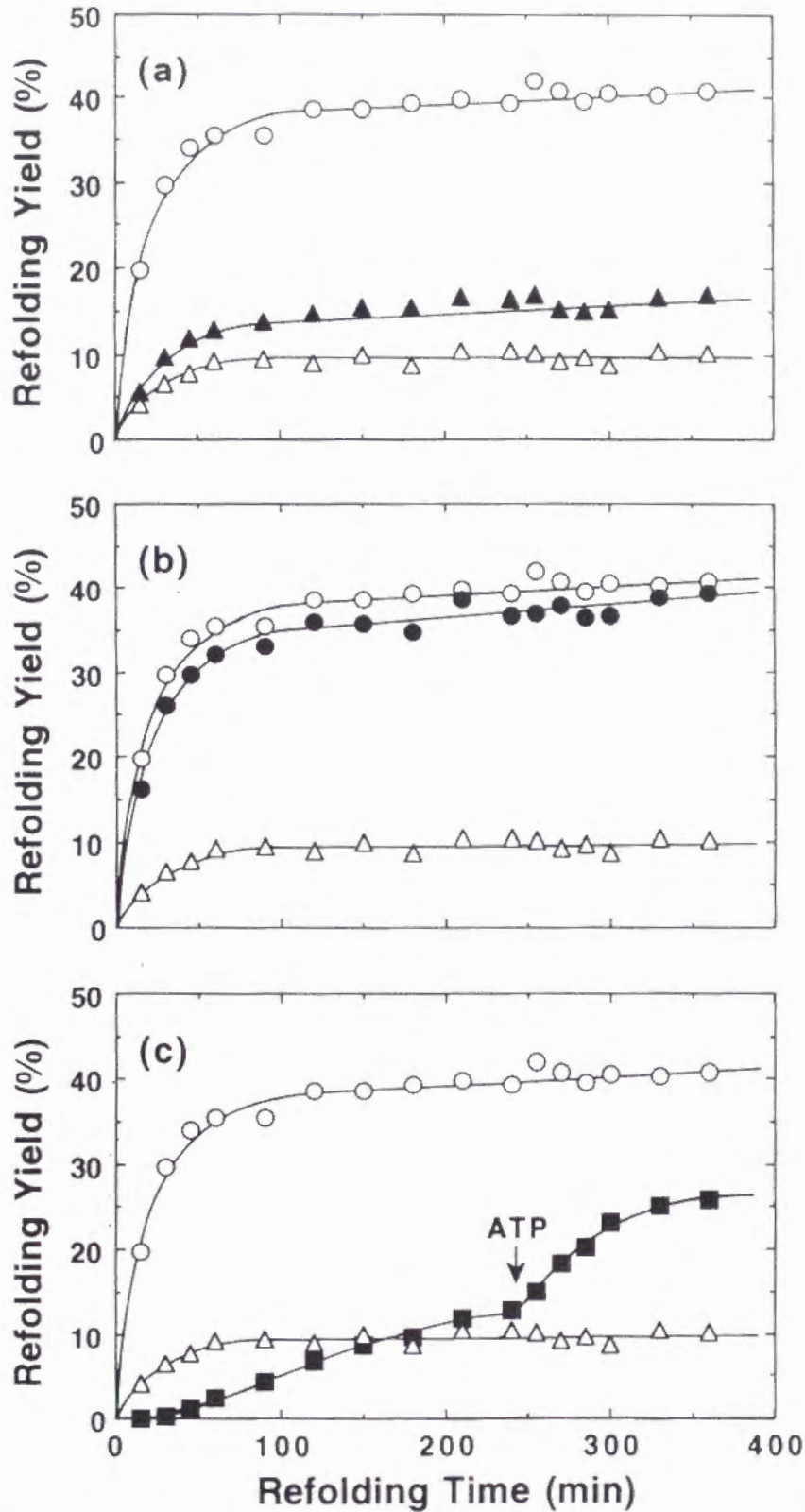


図 2.6. “GroE複合体”を構成するGroEL, GroES, ならびにヌクレオチドA T Pの具体的な役割。図 (a)~(c)の黒いシンボルはGroE複合体を形成する3つの因子のうち一つのみを欠失させた反応緩衝液中でトリプトファナーゼを構造形成させた場合の活性回復の様子を示す。(a)▲, GroEL非存在下;(b)●, GroES非存在下;(c)■, A T P非存在下。各図に示した○は完全なGroE複合体存在下でのGroELの活性回復の様子, △はトリプトファナーゼの自発的な活性回復の様子を比較のために示した。図 2.6(c)の実験では矢印で示した時点で反応液にA T Pを2 mM添加した。GroELとGroESを添加した場合はトリプトファナーゼサブユニットモル濃度の5倍量加えた。

より能率はよかったものの、その速度は著しく抑制された（図26(c)）。このATPを含まない反応溶液に途中から2 mM ATPを添加すると（図26(c), 矢印），急激な活性回復を見せ、完全なGroE複合体存在下での活性回復率と自発的なフォールディングの活性回復率の中間に当たる活性回復率を見せた。

次に、GroE複合体がトリプトファナーゼに与える具体的な影響を調べるためにフォールディング反応中のアグリゲーション形成の様子を光散乱強度の測定により観測した。図27に示したように、フォールディング反応溶液中のGroEの濃度が増加すればするほどトリプトファナーゼのアグリゲーション形成の速度が減少することが明らかとなった。なお、図中には示さなかったが前述の通り、自発的なフォールディング反応の場合、アグリゲーションの形成は試料調製に要する時間（約11秒）内にほぼ完了する。

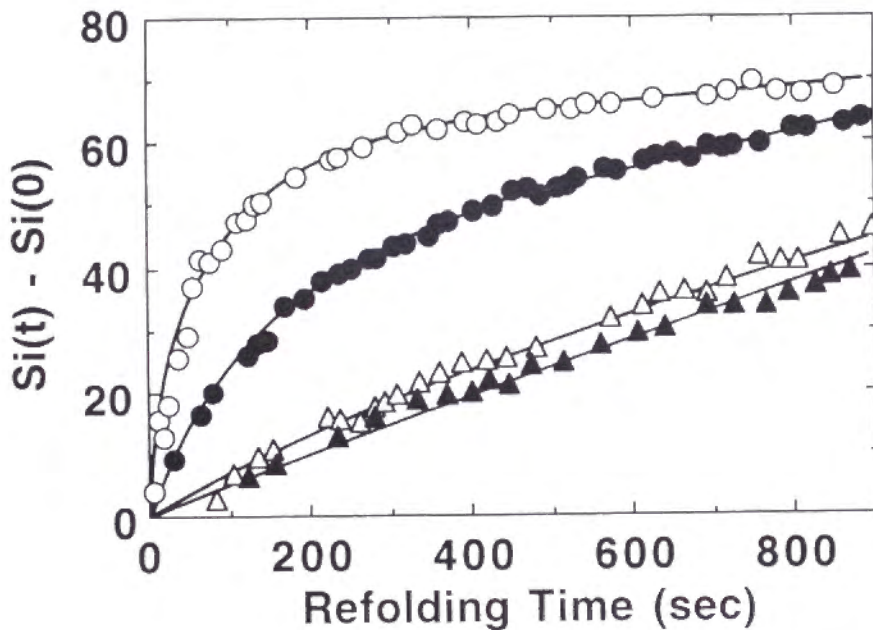


図27. トリプトファナーゼのフォールディング反応におけるGroEの役割：光散乱強度変化の測定。反応液中に様々な濃度のGroEL及びGroESを添加し、トリプトファナーゼを構造形成させた際の光散乱強度の変化を測定した。この際GroEとトリプトファナーゼとの相互作用をできる限り安定なものにするため、ATPは添加していない。トリプトファナーゼのサブユニットモル濃度とGroEのオリゴマーモル濃度の比は：○，1：1；●，3：1；△，10：1；▲，15：1。トリプトファナーゼの濃度は5  $\mu$ g/mlであった。溶液中に存在するGroEに由来する光散乱を考慮して、それぞれのデータは生のデータより時間0における光散乱強度を差し引いた値“ $Si(t)-Si(0)$ ”として表示した。

### 3-B-2. GroEのヌクレオチド特異性に関する実験

トリプトファナーゼのフォールディング反応を補助する際にGroEはATPを要求することは図26(c)の実験において明らかとなった。このATPが担う役割をより詳細に解析するために、ATPに構造が類似した様々なヌクレオチド類似体を反応溶液

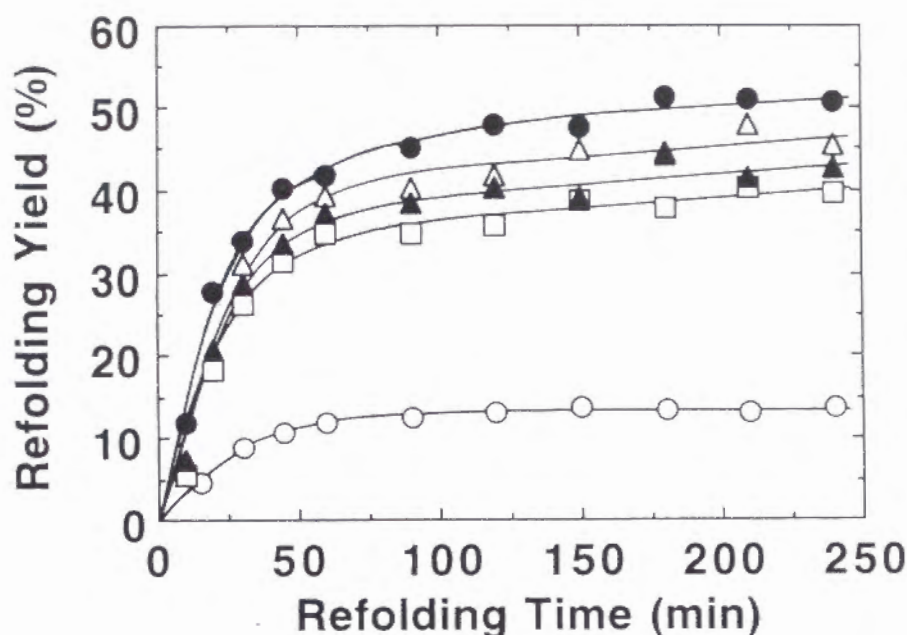


図28. 様々なヌクレオチド存在下でのGroEの効果。GroE存在下でのトリプトファナーゼのフォールディング反応を、ATPならびにATPに類似した様々なヌクレオチドを添加して行った。ヌクレオチドの濃度は2 mM に統一した。トリプトファナーゼの濃度は5  $\mu$ g/ml, GroEの濃度はトリプトファナーゼに対し5 倍量である。図中○はトリプトファナーゼの自発的フォールディングの様子, ●はGroE, 及び2 mM ATP存在下でのフォールディングを示す。△, 2 mM ATP- $\gamma$ -S存在下でのフォールディング; □, 2 mM AMP-PNP存在下でのフォールディング; ▲, 2 mM ADP存在下でのフォールディング。実験温度は25℃。

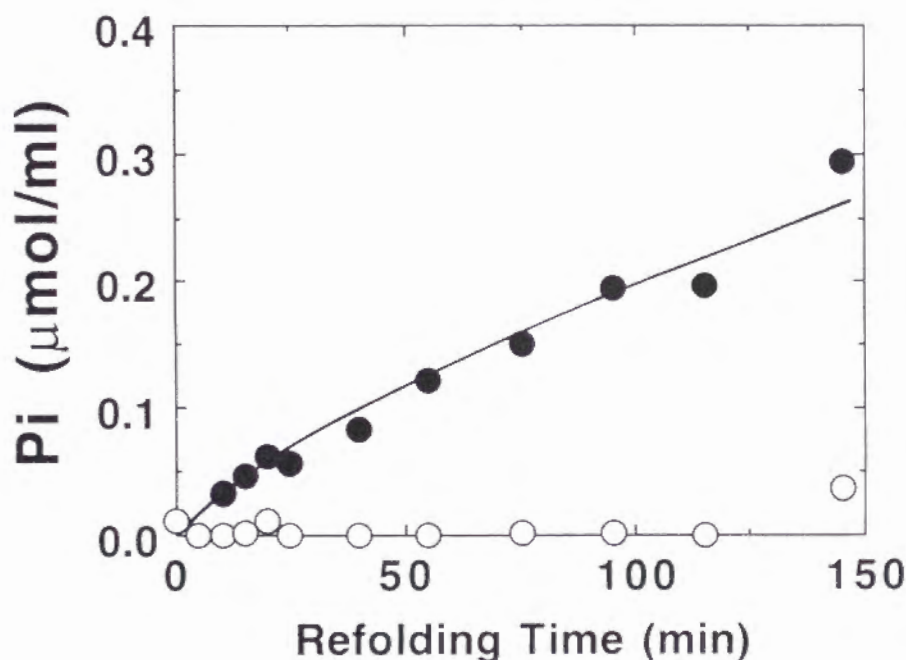


図29. フォールディング反応中のヌクレオチド加水分解の有無。ATP及びADP存在下でトリプトファナーゼを構造形成させた際にGroELがヌクレオチドを加水分解する様子を比色検定法により定量した。反応溶液中のトリプトファナーゼの濃度は10  $\mu$ g/ml, GroEの濃度はトリプトファナーゼのサブユニットモル濃度に対し0.5 倍になるように調整した (GroELの濃度: 77  $\mu$ g/ml, GroESの濃度: 6.9  $\mu$ g/ml)。実験温度は25℃。縦軸の単位はヌクレオチドの加水分解を伴い増加する溶液中のリン酸の濃度を示す。すべての値は非酵素的加水分解に由来するリン酸の増加分を差し引いて示した。



中に添加し、トリプトファナーゼのフォールディング反応にどのような影響を与えるかを調べた。図28に示したように、フォールディング反応液中にATPに類似しているがGroEにより加水分解されないATP- $\gamma$ -Sや、AMP-PNPなどの類縁体存在下でもトリプトファナーゼの活性回復率は改善されることが明らかとなった。更に興味深いことに、GroEがATPを加水分解することにより生じる産物、ADPを反応溶液中に添加してもATPとほぼ同じ効果が得られた。GroELはATP存在下で蛋白質のフォールディングを補助する際にATPを加水分解することが知られているので、ATPとADPの二種類のヌクレオチドについてフォールディング反応中にGroELにより加水分解されるかどうかを比色検定で調べたところ、図29に示したように、ATPはGroELにより加水分解されたが、ADPは加水分解されていないことが明らかとなった。

GroE存在下、ヌクレオチド非存在下でのトリプトファナーゼの活性回復率とATPを添加した際の活性回復率の差より、GroE複合体がトリプトファナーゼのフォールディング反応に示す効果は何らかのヌクレオチド濃度依存性を持つ現象であると考えられたので、トリプトファナーゼの活性回復率と反応溶液中のヌクレオチド濃度との相関関係を調べた。図30に示したように、トリプトファナーゼのフォールディン

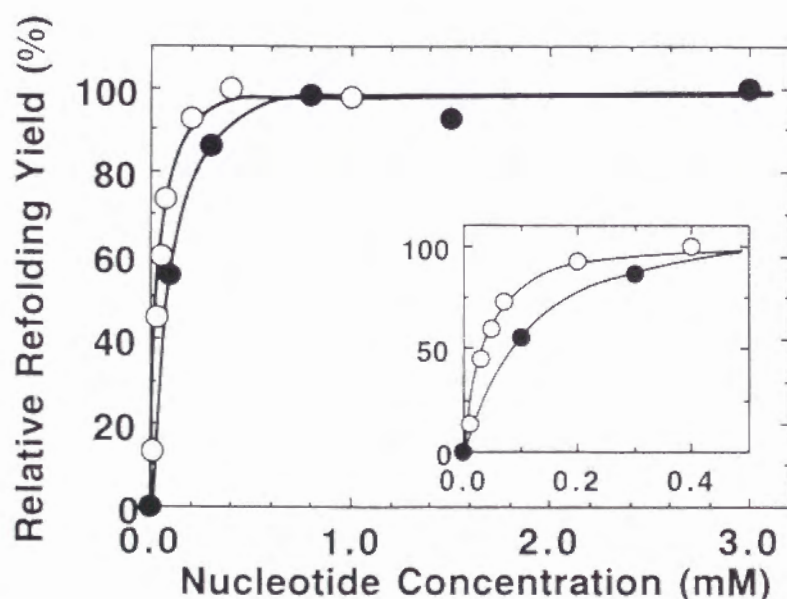


図30. トリプトファナーゼの活性回復率とヌクレオチドの濃度との関係。トリプトファナーゼをGroEL, GroES及び様々な濃度のヌクレオチド(ATP, ADP)存在下で150分間構造形成させそれぞれのサンプルの活性回復率を測定した。得られた活性回復率をヌクレオチド濃度の関数としてプロットし、GroELとヌクレオチドとの親和性の指標として利用した。図の横軸は反応溶液中のヌクレオチド濃度、縦軸は2 mMヌクレオチド存在下における活性回復率と自発的フォールディングにより得られる活性回復率との差を100分率で表した“相対活性回復率”である。反応溶液中のトリプトファナーゼの濃度は5  $\mu$ g/ml。○, ATP; ●, ADP。

グ反応に対するGroE複合体の効果はやはりヌクレオチド濃度に依存し、ATPに関しては約  $30 \mu\text{M}$  で効果の50%を発現し、ADPに関しては約  $85 \mu\text{M}$  で効果の50%を示した。

なお、結果には示さなかったが、図26(a)~(c)に示したような実験をATPではなくADPを用いて行った結果、ADPはATPとほぼ同じ効果を見せることが実験より明らかとなった。

### 3-C. GroELの変性反応に関する実験

トリプトファナーゼのフォールディング反応にGroEが特異的に作用し、活性回復率を向上させることが明らかとなったので、GroEの効果を他の蛋白質のフォールディング反応に作用させ、GroEに関する知見を得ようと考えた。この様な実験を行う際にはGroEが効果を発現しうる溶液の条件を確認する必要がある。即ち、GroEL自身の活性、いわゆるシャペロニン活性がどのような条件下で保持されるのかを検討しなければ、標的となる蛋白質が構造を形成する条件下でGroELが変性してしまう事態も考えられる。そこで、GroELの構造安定性を検討するために変性剤と熱を用いて一連の実験を

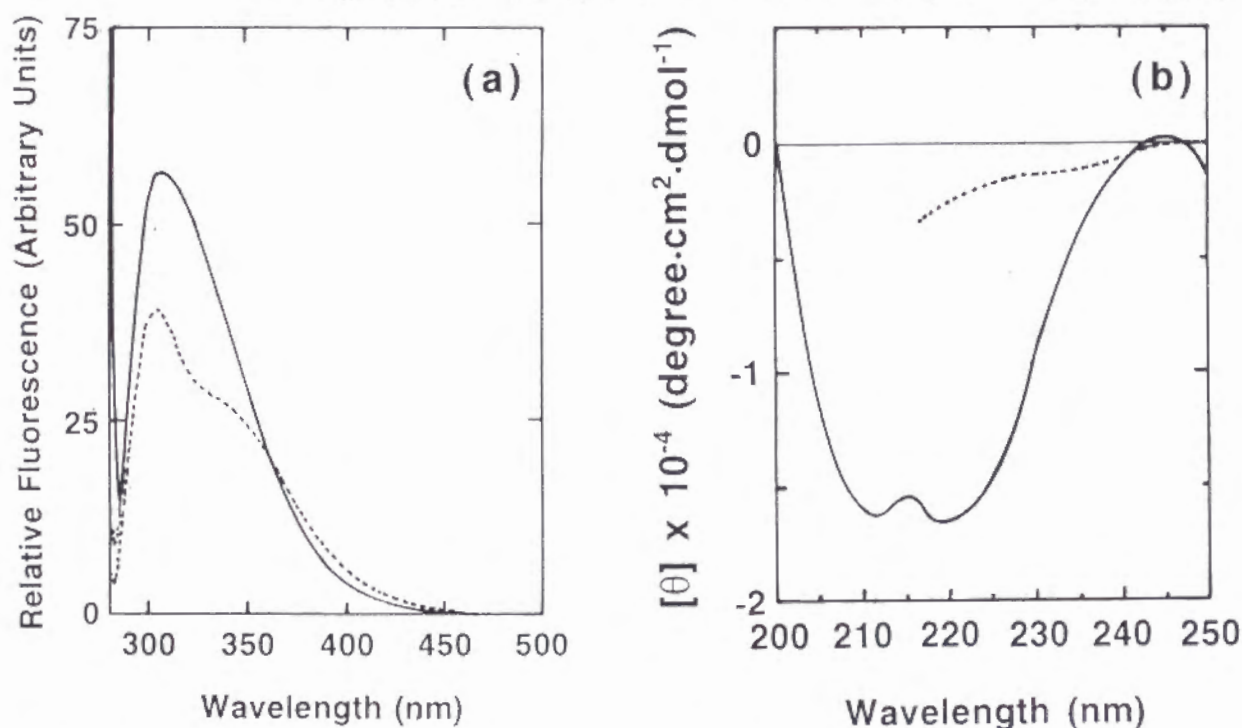


図3.1. GroELの蛍光スペクトル及びCDスペクトル。GroELの濃度は  $50 \mu\text{g/ml}$ 。(a) 蛍光スペクトル。励起波長は278 nmで測定した。実線はネイティブ状態のGroELの蛍光スペクトル、点線は4 M Gdn-HCl中のGroELの蛍光スペクトルである。(b) CDスペクトル。測定は1 mmセルを用いて行った。実線はネイティブ状態のGroELのCDスペクトル、点線は4 M Gdn-HCl中のGroELのCDスペクトルである。測定温度は共に  $25^\circ\text{C}$ 。

行った。変性反応を解析するにあたってはGroELのアミノ酸配列内にある6残基のチロシンに由来する蛍光の強度変化、ならびに二次構造が形成されると現れるCDの吸収の変化を観測することにした。図3-1にGroELの蛍光スペクトルならびにCDスペクトルを示した。GroELはアミノ酸配列内にトリプトファン残基を持たないので(124)、蛍光スペクトルは励起波長278 nmにて測定し、配列内のチロシン残基の蛍光を検出した。GroELの蛍光スペクトルは308 nmにピークがあり、このピークの強度はGroELが変性すると低下する。CDスペクトルはごく典型的な蛋白質のCDスペクトルであり、208 nmと222 nmにおいて二次構造形成に由来する負の吸収が観測された。このCDスペクトルの負の吸収はGroELが変性するとほぼ完全に消失する。

### 3-C-1. GroELの熱安定性

まず、GroELのシャペロニン活性が保たれる限界の温度を調べるために、GroELのATPアーゼ活性が短期間の熱処理に対しどれほど保持されるかを調べた。50℃以上の温度でそれぞれ10分間、熱処理を行った後に氷中で急冷し、保持されたATPアーゼ活性を測定したところ、図3-2に示したようにGroELは65℃まで100%活性を保持し、67℃から68℃で熱処理した際に初めてATPアーゼ活性が50%に減

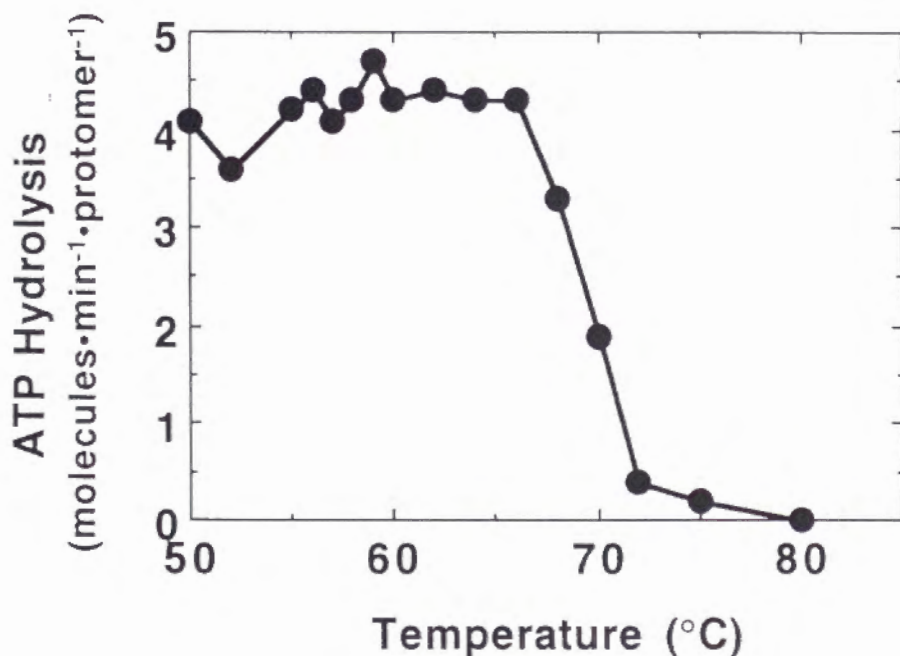


図3-2. GroELの熱安定性。50  $\mu$ g/ml GroEL に調製したサンプルを1分間、横軸に示した温度で熱処理した後、氷中で急冷した。このサンプルに放射性ラベルされたATPを添加し、1分間反応させた後に“材料と方法”に示した方法で加水分解されたATPの量を定量した。縦軸の単位は1分間あたりにGroELサブユニット1分子が加水分解するATPの分子数を表す。



少した。GroELはかなりの高温まで活性，ひいては高次構造を保持することが，この実験の結果より明らかとなった。

### 3-C-2. 蛍光スペクトル変化の解析によるGroELの変性反応

次に，変性反応に関するデータを蛍光スペクトル変化により測定した。まず，トリプトファナーゼの変性反応の場合と同様，様々なGdn-HCl濃度に調製した緩衝液中にGroELを添加し，2時間放置した後に308 nmにおける蛍光強度を測定した。併せて，サンプルのアグリーゲーションの度合いを確認するために励起波長と同じ波長で光散乱強度の変化を測定した。図3.3にその結果を示した。データを採取してまず明らかになったことは，GroELはいかなる濃度のGdn-HCl中でもアグリーゲーションを形成しない

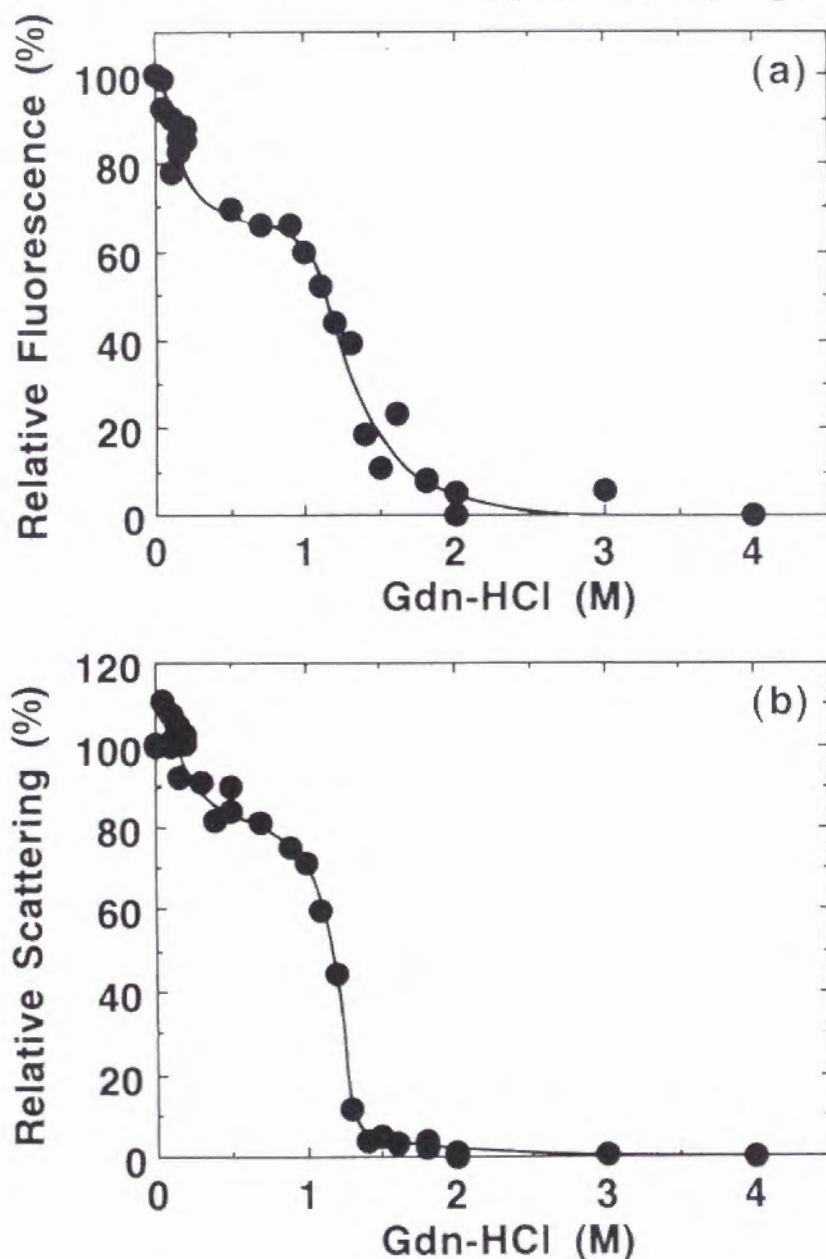


図3.3. 蛍光スペクトル変化により観測するGroELの変性反応。サンプル中のGroEL濃度は50  $\mu$ g/ml。GroEL変性反応用緩衝液にあらかじめ計算された濃度のGdn-HClを添加し，GroELを加えて2時間室温で放置した。それぞれのサンプルを励起波長278 nm，測定波長308 nm（チロシン由来の蛍光強度）及び278 nm（散乱強度）にて測定し，その値をGdn-HCl濃度に対してプロットした。データを結ぶ曲線は理論的な計算により算出したものではなく，スペクトル変化の様子をとらえやすくするための補助線である。図中には異なる2つの実験結果をあわせて示した。(a) 308 nmにおける蛍光強度の変化；(b) 278 nmにおける光散乱強度の変化。サンプルの平衡状態を確認するために同じサンプルを更に24時間放置し，再び同じように測定したが，著しい強度の変化は観測されなかった。

ことであった。極めて希薄なGdn-HCl濃度においてごくわずかな光散乱強度の増加を観測したが、そのサンプルにおいても24時間放置した後にはむしろネイティブ状態の光散乱強度よりも減少しており、それ以上のGdn-HCl濃度でもアグリゲーション形成を示唆する急激な光散乱強度の増加はみられなかった。更に重要な知見としては、GroELの変性反応は二状態転移で近似できる物ではなく、少なくとも1種類の平衡論的に安定な中間状態を持っていることであった。図に示したように、GroELは1 M Gdn-HCl以下の変性剤濃度でネイティブ状態の約30%に相当する蛍光強度、ならびに光散乱強度を失い0.5 M Gdn-HClから1.0 M Gdn-HClにかけてGdn-HCl濃度が増加しても蛍光の強度が変化しない領域、プラトーを形成する。1 M Gdn-HCl以上の濃度で再び蛍光強度と散乱強度が減少し、最終的な変性状態に移行する。蛍光スペクトルの分析により得られた変性曲線は、GroELの濃度を25  $\mu\text{g/ml}$  から100  $\mu\text{g/ml}$  まで変化させても観測できるほどの差は現れなかった。また、他の研究室でADPをGroELに作用させるとGroELの構造が大規模に変化することが報告されているが(202), 0.5 mM ADP存在下においても変性曲線に変化はみられなかった。

一方、同じ実験をCDスペクトル測定により行くと、この第一の変性反応は観測されず、単純な二状態転移といえる変性曲線が得られた(図34)。従って、GroELの変性中間体はネイティブ状態と二次構造の含有量がほぼ変化していない、しかし四次

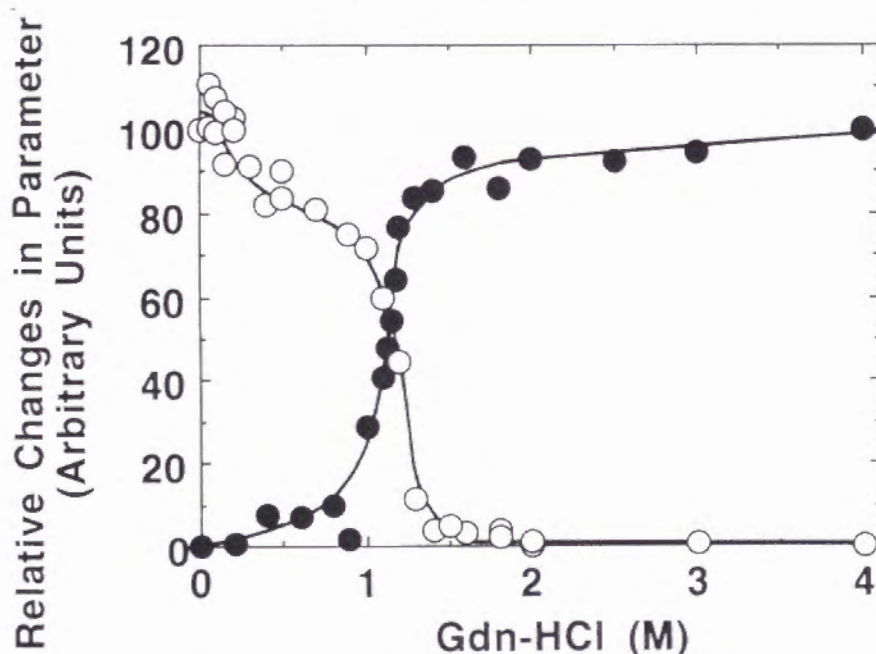


図34. 222 nmにおけるCDスペクトル変化を指標にしたGroELの変性反応の解析。サンプル中のGroELは50  $\mu\text{g/ml}$ 。図33と同様の方法で調整したサンプルを室温で12時間放置した後にそれぞれのサンプルの222 nmにおけるCDスペクトル変化を測定した。ネイティブ状態のCDスペクトル強度と変性状態のCDスペクトルの差を100とし、すべてのデータを相対値で表示した(●)。比較のために、図33(b)で示した光散乱強度変化を同様に規格化し、図中○で表示した。

構造（光散乱強度の変化）や特定のアミノ酸残基近傍の環境が変化している（蛍光スペクトル変化）様な中間体であると推定された。

変性中間体の性質をさらに調べるために、GroELの変性反応溶液中に疎水性部位を認識・結合し、強い蛍光を発する試薬、ANSを添加し、ANSに由来する蛍光強度の変化を観測した。ANSの蛍光は水中においては蛍光最大波長が515 nm付近、量子収率が0.004であるのに対し、エタノールなどの有機溶媒中では蛍光最大波長が468 nm、量子収率が0.37となり、ANSが水中の極性環境から有機溶媒などの疎水性環境に移行すると発する蛍光は約200倍に増加する(203)。GroELの分子表面に疎水性領域が露出していると、ANSがこの領域に結合し、470 nm付近において強い蛍光を発するので、この試薬が変性反応溶液中にあると分子表面の様子が観測される。図35に示したように、GroELの第一変性反応においてANSの蛍光が顕著な増大を見せている。これは、この反応において疎水性領域が露出していることを示唆している。

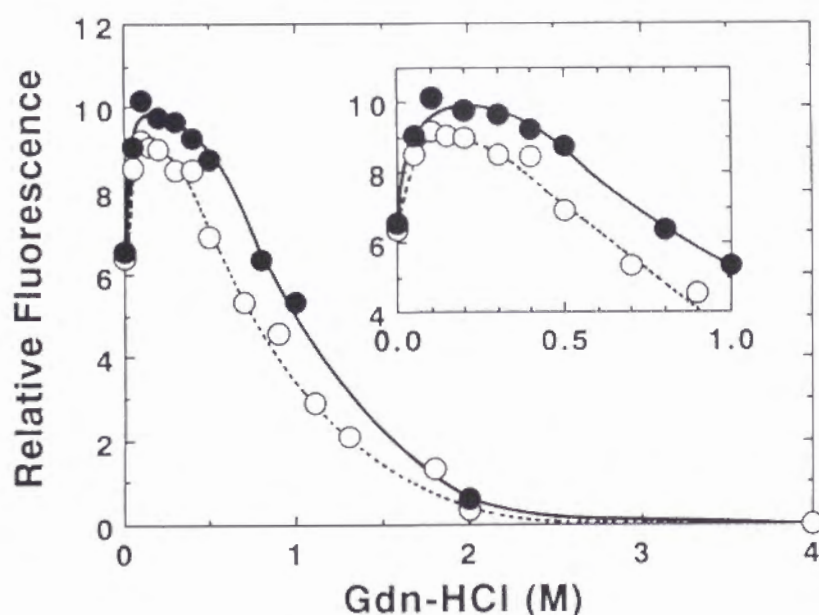


図35. GroELの変性反応におけるANSの結合の変化。図33に示した実験と同様の方法でGroELを変性させたが、その際反応溶液中に $2.0 \times 10^{-6}$  MのANSを加え、励起波長 370 nm、測定波長 485 nmにおいて蛍光強度の変化を測定した。図中●は通常の方法で精製したGroELを用いて行った実験、○はATP存在下でゲル濾過クロマトグラフィーを行うことにより更に高純度に精製したGroELを用いて行った実験である。図の中の挿入図は0 Mから1.0 M Gdn-HClまでの変性剤領域を拡大して表示した図である。縦軸の単位は本図と同じ。

GroELがGdn-HCl中で見せるこの蛍光強度の変化は、実は中間状態の形成を示す物ではなく、単にGroELに結合したポリペプチド鎖がGdn-HClの作用で解離している様子を観測しているという可能性があった。Hayer-HartlらはGroELの純度に関する詳細な研



究を行っており、彼らは GroEL は必ずある割合で短いペプチドなどが結合したままの状態に精製され、通常の精製法では取り除けないことを報告した(204)。更に、混入されているペプチドは本研究で使用している GroEL の純度を検定する際に利用している SDS-PAGE 分析では検出しにくく、一見純度の高い試料であっても混入しているペプチドが存在するケースが多いことを Hayer-Hartl らは報告した(204)。図 3 3 と 3 5 に示した結果が GroEL に結合したペプチドの解離によっても容易に説明できたので、この可能性を否定するための実験を数種類行った。まず、GroEL の純度を向上させるために、通常の精製法で精製した GroEL 試料を ATP、ならびに GroES と混合し、反応させて GroEL に結合しているペプチドを解離させた後、ATP 存在下でゲル濾過クロマトグラフィーを行った。この手順を踏めば、GroEL から大部分のペプチド挟雑物を取り除かれる。この高純度試料を用いて再び図 3 5 に示したような実験を行うと、やはり同じ結果が得られた(図 3 5, ○印)。更に、高純度に精製された GroEL を 0.5 M Gdn-HCl 中で 1 時間放置した後、透析により変性剤を取り除いて得られた GroEL 試料を使って図 3 3 と図 3 5 に示したような実験を行ったところ、やはり同じ結果が得られた。この実験は変性中間体が実在することを証明するだけでなく、この中間体を形成する反応は可逆であることも証明している。更に、この変性反応が観測される Gdn-HCl の濃度中で GroEL はシャペロニンとしても作用することが確認されている(145, 152)。

最後に、GroEL の変性中間状態の四次構造に関する知見を得るために Gdn-HCl を含む緩衝液中で GroE をゲル濾過クロマトグラフィーにより分析した。Gdn-HCl を含まない緩衝液においては GroEL は分子量 669,000 のチログロブリンとほぼ同じ溶出位置に現れたが、緩衝液に Gdn-HCl が含まれると GroEL の溶出位置は分子量およそ 620,000 に相当する位置に変化した。この溶出位置はその後 Gdn-HCl 濃度が分析可能な限界の Gdn-HCl 濃度、0.6 M Gdn-HCl 中でも変化しなかった。

なお、以上の結果のすべてはネイティブ状態の GroEL を Gdn-HCl 中で変性させて得た、変性反応のみに関した実験結果である。完全に変性させた GroEL について、ATP アーゼ活性で追跡するフォールディング反応を試みたが、ATP アーゼ活性が GroEL の場合あまりにも弱いことと、GroEL が自発的には非常に構造を形成しにくいことが災いして GroEL のフォールディング反応に関するデータは得られなかった。ただ、GroEL は変性反応で使用する Gdn-HCl を含む溶液中ではアグリゲーションを形成せず安定であるが、変性剤を希釈した際に大きな光散乱強度の変化が検出されたので、GroEL は、フォールディング反応開始時の急激な変性剤濃度の変化に極めて弱いと考えられる。

### 3-D. シャペロニン存在下でのPEPCのフォールディング反応

GroELが極めて分子量の大きい、四次構造の複雑なオリゴマー酵素のフォールディング反応に対し作用するかを調べるために、同じ大腸菌内に発現されるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、PEPCを標的蛋白質としてGroEの作用を観測した。

PEPCの自発的フォールディング反応は試験管内ではほとんど進行せず、活性回復率が10%以下という、ほぼ不可逆な変性を示す。この蛋白質のフォールディング反

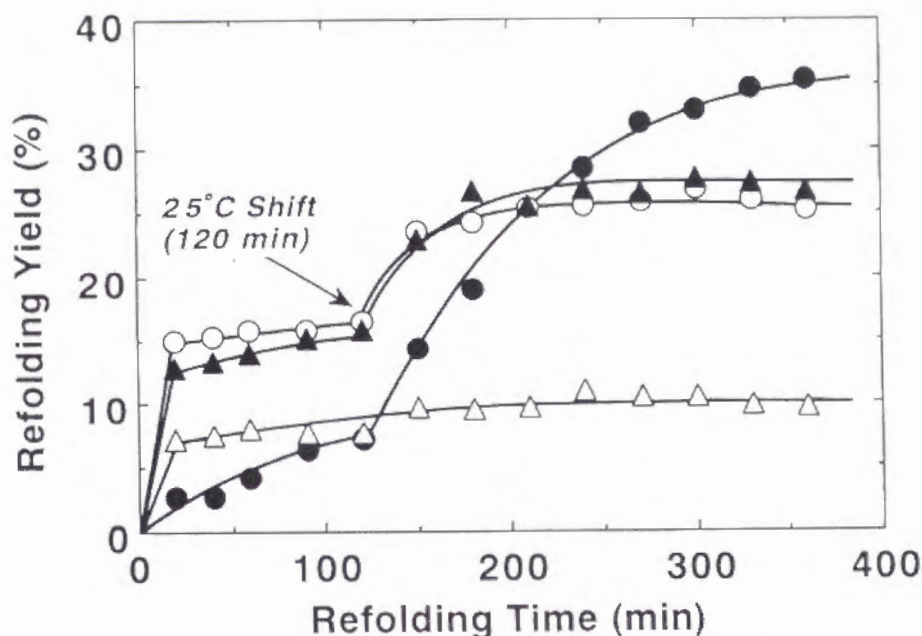


図3-6. PEPCのフォールディング反応におけるGroEの効果, ならびにGroE複合体を構成する各成分の役割。GroE複合体を構成する成分が添加されたPEPCフォールディング反応用緩衝液を0℃にあらかじめ平衡化し、この緩衝液に6 M Gdn-HCl中で完全に変性させたPEPCを添加し、フォールディング反応を開始させた。適時サンプルを取り出し、“材料と方法”で記した方法により活性測定した。反応開始後2時間の時点ですべてのサンプルを25℃に移し(図中矢印)、フォールディング反応を続けた。データはトリプトファナーゼのフォールディング反応と同様、活性回復率として記している。ATPが溶液に添加されている場合は濃度を2 mMとした。○, 完全なGroE複合体(GroEL, GroES, ATP)存在下でのPEPCのフォールディング; ●, GroEL・GroES存在下, ATP非存在下でのフォールディング; △, GroEL非存在下でのフォールディング; ▲ GroES非存在下でのフォールディング。反応溶液中のPEPCの濃度は25 μg/ml, GroEL・GroESの濃度はPEPCのサブユニットモル濃度に対し5倍量添加した。

応はトリプトファナーゼと同様、BSAや界面活性剤などを添加しても変化しなかった。そこで、GroEL・GroES, ならびにATPをフォールディング反応溶液に添加し、効果を調べたが、25℃ではGroE複合体も目立った効果を見せなかった。PEPCのフォールディング反応を光散乱分析で観測すると、やはりトリプトファナーゼと同様に、構造を形成する際にアグリーゲーションを形成するため、ネイティブ構造を回復できる蛋白質分子の量が極端に少ないことが明らかとなった。PEPCのフォールディング反応途中にアグリーゲーションが関与している過程が存在することが確認されたので、



GroEがPEPCのフォールディング反応を本質的に補助することができないのではなく、条件さえ検討すれば補助されることが期待できた。そこで、PEPCのフォールディング反応を行う条件、特に、フォールディング反応中のアグリゲーションが形成される、反応初期の実験条件を検討することにした。最終的には、トリプトファナーゼの自発的フォールディング反応の結果を踏まえて、PEPCのフォールディング反応を低温で開始させ、PEPCとGroELとの相互作用、そしてPEPCのフォールディング反応におけるGroELの特異的な効果を確認することに成功した。図36には、GroEを構成する因子、GroEL、GroES、そしてATPをそれぞれ選択的に欠いたフォールディング反応溶液中でPEPCの構造を形成させた場合の活性回復の様子を示した。この図に示した実験ではフォールディング反応を0℃で開始させ、反応開始後2時間の段階で25℃に昇温させている。GroELを欠いた反応溶液ではPEPCの自発的なフォールディング反応と同様に、活性回復率は10%未満であった。このことは、トリプトファナーゼの自発的なフォールディング反応とは異なり、PEPCの最終的な活性回復率は温度の影響を受けにくいことを示す。一方、完全なGroE複合体、ならびにGroESを欠いたフォールディング反応液中では反応開始後15分でおおよそ15%の活性回復を見せ、その後25℃に昇温させると更に活性が回復し、最終的には25%程度の活性回復率を示した。即ち、0℃でフォールディングを開始させるとGroEの添加によりPEPCの活性回復率は約2.5倍改良された。しかし、最も興味深い結果はATPを欠いたフォールディング反応液より得られた。0℃で反応を進行させていた際の活性回復は他のサンプルよりも目立って遅く、活性回復率も自発的フォールディングの場合とほぼ同じであった。しかし、反応液を25℃に昇温させた時点より、急激な活性の回復を見せ最終的な活性回復率はATP存在下での活性回復率よりも約10%高い、35%となった。即ち、PEPCにおいては、ヌクレオチドを添加している場合よりヌクレオチド非存在下の方が能率良くフォールディング反応が進行する事が明らかになった。

PEPCのフォールディング反応を0℃で開始させるとGroEはPEPCに特異的な効果を示すことが明らかとなったので、次は0℃で反応を進行させる時間と活性回復率の関係を、0℃で反応を進める時間を変化させたフォールディング反応で調べた。図37では、0℃でフォールディング反応を開始させ、1時間0℃で反応を進行させた後25℃に昇温したサンプル、0℃で反応を開始させ直ちに25℃に昇温したサンプル、そして一貫して25℃でフォールディング反応を行ったサンプルの、計3種のサンプルにつきそれぞれの活性回復の様子を示した。一貫して25℃でフォールディン



グ反応を行ったサンプルは、やはり自発的フォールディングと同等の活性回復率しか見せなかったが、0℃で反応を開始させた2種のサンプルはほぼ同じ高い活性回復率を示した。注目すべき点は、0℃で反応を開始させ直ちに昇温したサンプルも、1時間0℃で反応を進めたサンプルに近い活性回復率を示したことであり、PEPCとGroELが相互作用するためにはフォールディング反応を0℃で開始させればよいことが示唆された。

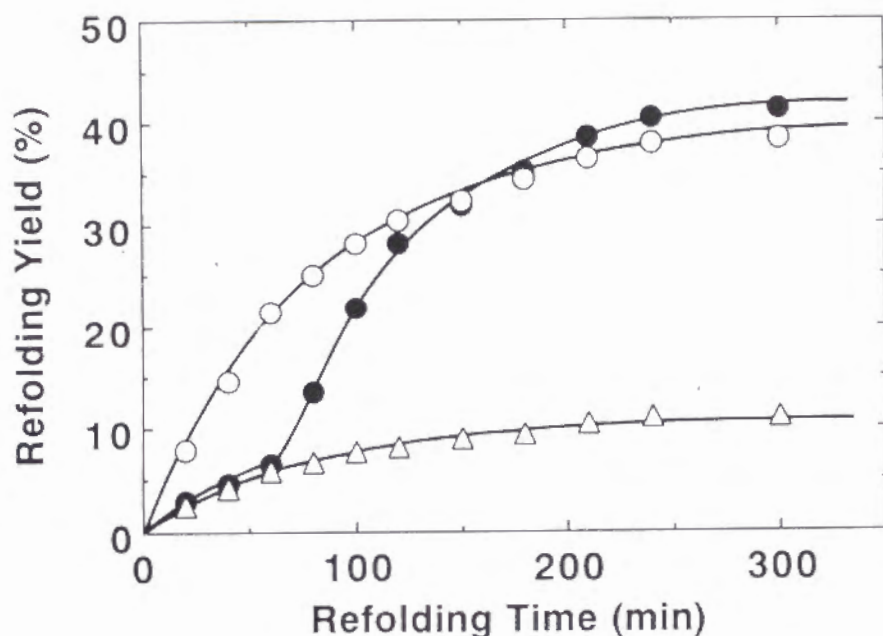


図3.7. 0℃においてフォールディング反応を進める時間とPEPCの活性回復率との関係。図3.6に示した実験手順に従ってPEPCの構造形成を開始させた。この際、0℃にてフォールディングを行う時間を変化させ、0℃で反応を進める時間とPEPCの活性回復率との相関関係を見いだそうとした。●は0℃において1時間反応させた後に25℃に昇温した実験、○は0℃にてフォールディング反応を開始させ直ちに25℃に昇温した実験、△は25℃でフォールディング反応を開始した実験である。

次に、0℃でフォールディング反応を開始することによりPEPCはどのようにしてGroELと相互作用が可能になるのかをより詳しく検討した。まず、図3.8にフォールディング反応開始温度を0℃から25℃に変化させた際のPEPCの活性回復の様子を示した。図に示したように、PEPCはフォールディング反応がより低温で開始されるほど高い活性回復率を示し、低温でフォールディング反応を開始させることとGroELとPEPCとの相互作用が容易になることとの因果関係をはっきりと示していた。次に図3.9には0℃でフォールディング反応を開始させた後に昇温させた温度を20℃から35℃まで変化させた場合のPEPCの活性回復の様子を示した。図3.9に示したように、フォールディング反応を開始する温度のみならず、フォールディング反応を完了させる温度も、PEPCが正しく構造を形成するための重要な条件であった。

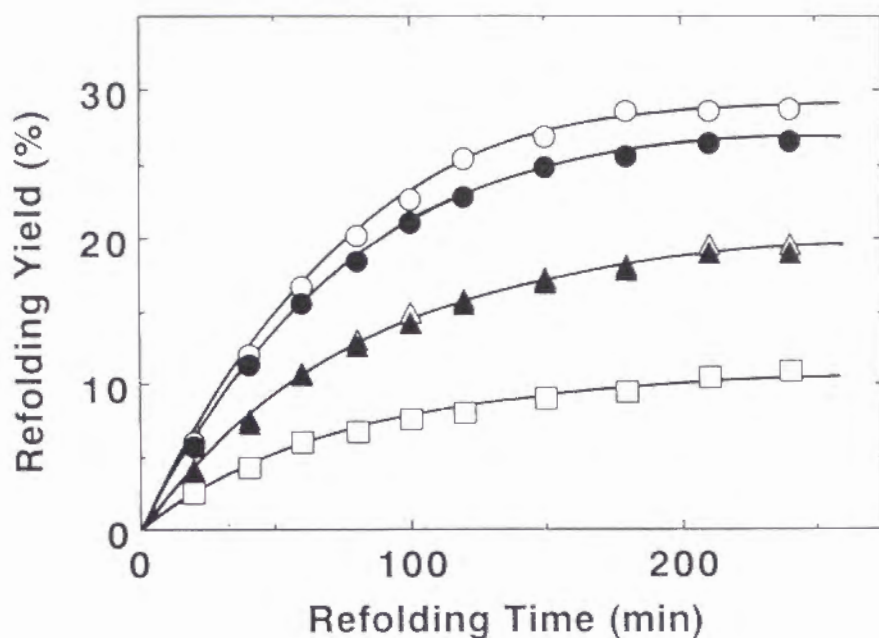


図38. 実験開始時の温度とPEPCの活性回復率の関係。GroEL・GroESを含むPEPCフォールディング反応用緩衝液を様々な温度で平衡化し、変性させたPEPCを添加した後、直ちに25℃に昇温させ、フォールディング反応を観測した。活性測定法は“材料と方法”に示したとおり。○, 0℃で実験開始; ●, 5℃で実験開始; △, 10℃で実験開始; ▲, 15℃で実験開始; □ 25℃で実験開始。

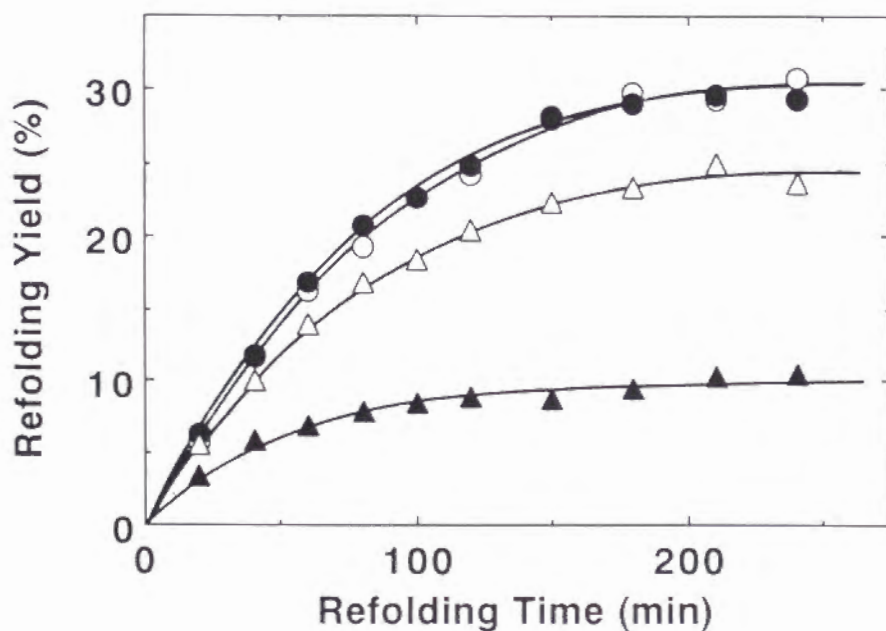


図39. フォールディング反応を完了させる温度とPEPCの活性回復率の関係。0℃で実験を開始させた後、様々な温度に昇温し、フォールディング反応を完了させた。○, 20℃でフォールディング完了; ● 5℃でフォールディング完了; △ 30℃でフォールディング完了; ▲ 35℃でフォールディング完了。

PEPCとGroELとの関係を最もよく表す結果はフォールディング反応中のアグリゲーションの量を測定することにより得られた。図40に示したように、25℃で行った自発的なPEPCのフォールディング反応中ではフォールディング中間体の顕著なアグリゲーションを観測することができた。この溶液中にGroE複合体を添加してもアグリゲーションは抑制されず、むしろ少し増加しているような傾向を見せた。0℃、GroEL存在下でフォールディング反応を開始させるとアグリゲーションは完全に抑制され、PEPCの活性回復率の向上がみられる。興味深いのは最後のデータで、アグリゲーションが抑制されているGroE存在下、ATP非存在下のフォールディング反応溶液に4 mMのATPを添加すると、直ちに顕著なアグリゲーションの増加が観測された。

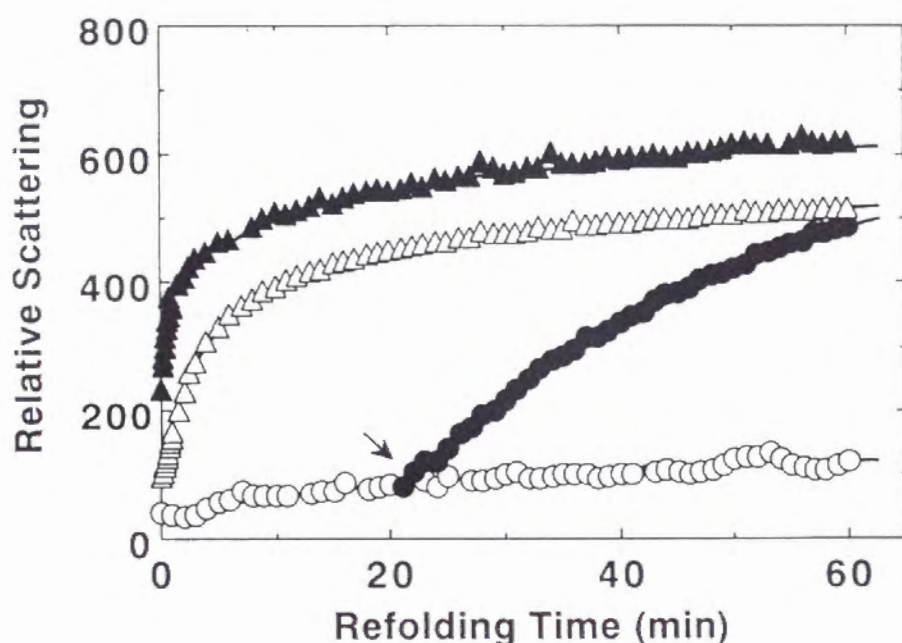


図40. PEPCのフォールディング反応中に生じるアグリゲーションの様子。GroELを構成する成分、ならびにATPをそれぞれ添加した反応溶液を0℃に平衡化し、これに変性したPEPCを添加することによりフォールディング反応を開始させ、直ちに295 nmにおける光散乱強度を測定した。蛍光の測定条件は25℃であるので、フォールディング反応開始直後に反応溶液は25℃に昇温される。図に表示したそれぞれのデータはPEPCを添加する前のサンプルの25℃における光散乱強度を差し引いたものである。△, PEPCの自発的フォールディングを伴う光散乱強度の増加；▲, GroEL存在下で25℃にてフォールディング反応を開始させた場合の光散乱強度の増加；○, GroEL存在下、0℃でフォールディング反応を開始した場合の光散乱強度の増加；●, 図中矢印で示した時点に○で示した反応溶液に4 mM ATPを加えた場合の光散乱強度の増加。



## § 4 . 考 察

### 4-A. トリプトファナーゼの変性反応

1974年にLondonらはトリプトファナーゼのフォールディング反応に関する研究を報告し、その中で彼らはトリプトファナーゼのフォールディング反応が非特異的なアグリゲーションにより制限されていることを報告した(167)。このアグリゲーションはトリプトファナーゼのフォールディング反応中に形成されるある中間状態が分子表面に疎水性領域を露出しているために生じた(167)。本研究ではLondonらが明らかにした事実を更に発展させるためにトリプトファナーゼの変性反応とフォールディング反応を速度論的に解析し、アグリゲーションを形成する中間状態に至るまでの過程やトリプトファナーゼのフォールディング反応途中に現れるその他の中間状態を明らかにすることを目的とした。

蛍光スペクトルの変化より観測されたトリプトファナーゼの変性反応は少なくとも2個の中間状態を含むことが明らかとなった(図17)。一つは1.0 M Gdn-HCl以下の低濃度の変性剤中で観測されるもので、補酵素PLPの結合部位近辺に構造変化が生じるものであることがPLPへの蛍光エネルギー移動に由来する500 nmにおける蛍光強度変化より明らかとなった(図17(a))。この変化がPLPの脱離を招くことはシッフ塩基形成に特有の420 nmにおける吸光スペクトルの変化より明らかとなり、またこの反応が一旦完了しても変性剤濃度を希釈し、補酵素を添加することによりもとのホロトリプトファナーゼを得ることのできるほぼ可逆な変化であることも実験より明らかとなった。従って、トリプトファナーゼの第一段階の変性過程はPLP結合部位近辺の微小な構造変化のために補酵素が脱離し、アポ酵素に類似した構造が形成されるものであると結論づけられる。

このような構造変化がトリプトファナーゼの全体構造に及ぼす影響についてはトリプトファナーゼの3種の構造、即ちアポ、ホロ、そして還元固定型のトリプトファナーゼに関する変性反応より類推された。図20に示した結果より、補酵素の結合に伴いホロトリプトファナーゼの構造はかなり安定化されることが明らかとなり、更に、補酵素の脱離を不可能にした還元固定型のトリプトファナーゼはホロ酵素よりも更に構造が安定化されることが解明された。逆に考えればホロトリプトファナーゼの変性反応において、補酵素が脱離した結果、ホロトリプトファナーゼは大きな構造的不安定化を受け、そのためその後の大規模な変性反応が容易に進むと思われる。この

考察はP L Pの蛋白質への結合様式を考えれば更に信頼できるものになる。P L Pを補酵素とするアスパラギン酸アミノ基転移酵素(205)やチロシンフェノールリアーゼ(206)などのX線結晶構造を比較すると、活性発現にP L Pを必要とするピリドキサル酵素は一般に数多くの水素結合を形成して補酵素を活性部位内に固定している。これらの水素結合は少なからず分子全体の構造安定性に寄与していると考えられるので、本研究で示したように変性中に補酵素P L Pが脱離すると分子の構造が不安定化しても不思議ではない。

トリプトファナーゼの第二の変性中間体は1.0 M から1.6 M Gdn-HClの中程度の変性剤濃度中で観測された。図17(b)で示したように、この濃度領域でのトリプトファナーゼの変性反応は他の領域に比べて目立って複雑であり、前述のP L P脱離に由来する蛍光強度変化の他にトリプトファナーゼの大規模な構造変化に由来する蛍光強度の減少、更にアグリゲーションに由来する光散乱強度の増加が同じサンプルについて観測された。中でもアグリゲーションを形成した過程は極めて特殊で、トリプトファナーゼの変性反応がある程度進行した後、即ち1.4 M Gdn-HCl中で20分放置した後に初めて観測された(図18)。つまり、トリプトファナーゼの構造変化に伴い、広範囲の疎水性部位が分子表面に露出するような構造変化が生じて初めてアグリゲーションが形成される。言い換えればこのアグリゲーションはトリプトファナーゼの変性反応中に疎水性部位を露出させた構造中間体が形成されている間接的な証拠になる。トリプトファナーゼの第二の変性中間体は従って三次構造の一部(もしくは全部)を失い、本来分子内部に埋もれている疎水性領域が分子表面に露出した様な中間状態であるといえる。この変性中間体とLondonらが報告したフォールディング中間体との関係は厳密には解明されていないが、性質の類似点を考えるとほぼ同じ様な構造である可能性は非常に高い。

トリプトファナーゼのこの中間状態に関連してごく最近の研究で興味深い結果が報告された。1993年にAntsonらは*Citrobacter freundii*由来のチロシンフェノールリアーゼに関するX線結晶構造解析の結果を報告した(206)。チロシンフェノールリアーゼはトリプトファナーゼと同様、活性発現にP L Pを必要とする酵素であり、基質が異なるものの、極めて類似した反応を触媒する事が知られている。アミノ酸配列の相同性も非常に高く、全アミノ酸配列の実に43%がトリプトファナーゼの配列と完全に一致するという高い相同性を持つ(206)。トリプトファナーゼに構造的にも機能的にも非常に似通ったこの酵素のX線構造解析により分子内にサブユニット間の相互作用



を担う非常に大きな疎水性中核領域（コア領域）が存在することが明らかとなった(206)。トリプトファナーゼの立体構造が明らかにされるまで断定することはできないが、トリプトファナーゼ自身の構造内にもこのような疎水性コア領域が存在し、この領域が分子の変性と共に表面に現れアグリゲーションを形成する原因となっている可能性は充分あり得る。

トリプトファナーゼの変性反応を以下の模式図にまとめた（図4-1）。

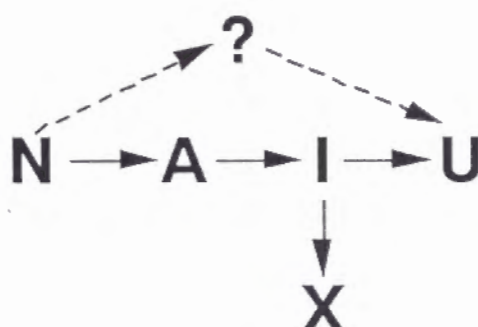


図4-1. トリプトファナーゼの変性反応。N, ネイティブ状態；A, アポ状中間体；I, アグリゲーションを形成しやすい中間状態；U, 変性状態；X, アグリゲーション。低温のGdn-HCl濃度中ではこの図の実線の矢印で示したような経路を経て変性することが確認された。現時点では断定できないが、高温のGdn-HCl中では別の変性経路（図中点線）が存在する可能性もある。もし存在するならばこの経路は、PLP結合部位以外の領域から変性が始まる様な過程である。

低濃度のGdn-HCl中ではまず補酵素PLPの脱離が観測され構造Aを形成する。補酵素脱離の結果トリプトファナーゼの全体構造が不安定化され、大規模な構造変化が起きる。その後分子表面に疎水性部位を露出させた構造中間体Iを形成し、完全な変性状態に移行すると思われる。充分低濃度の変性剤中ではこのアグリゲーションを形成しうる中間状態が安定に存在するために不可逆なアグリゲーションが観測される。逆に高濃度の変性剤存在下ではこれらの中間状態は不安定になるため、340 nmにおいてPLPの脱離、及びアグリゲーションは観測されず、図17(c)に示したような単調減少の変性曲線が得られる。不思議なことに、500 nmにおける蛍光強度変化は340 nmにおける変化とほぼ同じ速度で進行する様子が観測された。このデータの一つの解釈として変性剤濃度が高い場合はPLPの脱離とほぼ同時に分子全体の変性が起こっていると考えることができる。このように解釈すれば、上記の変性反応モデルは保存され、高濃度の変性剤中では変性反応を構成する各段階の速度定数のみが変わっていると結論できる。しかし、別の解釈をすれば、変性剤濃度が高い状態ではPLP結合部位と異なるある領域がまず構造を失い、その変化の結果としてPLPが脱離しているとも



考えることができる（図4 1，点線経路）。この後者の解釈では上記の変性反応モデルとは異なる別の変性過程が存在するという興味深い事実の証拠にもなるが，この二つの解釈のうちどちらが正しいかを断定するためにはトリプトファナーゼのより短時間の変性反応を詳細に解析する必要がある。

#### 4-B. トリプトファナーゼの自発的フォールディング反応

トリプトファナーゼのフォールディング反応は前述の通り，アグリゲーションによりかなりの制限を受け，最終的に活性を回復できる分子の割合（活性回復率）は約15%である。Londonらは試料中のトリプトファナーゼの濃度を低くし，透析することにより変性剤を除去してほぼ定量的にフォールディング反応を行うことに成功した(167)。しかし，透析法によりフォールディング反応を行うとその途中の過程を観測することができないという大きな欠点が存在するため，本研究ではより反応を観測しやすい希釈法によりトリプトファナーゼのフォールディングを分析しようと試みた。フォールディング反応を分析するにあたり，まずフォールディング反応中に生じるアグリゲーションができる限り抑制されるような実験条件を開発する必要があり，またアグリゲーションの形成の様子を解明することはトリプトファナーゼのフォールディング反応を理解する上で重要であるので，本研究においてはトリプトファナーゼの自発的フォールディング反応とアグリゲーションの関係に注目した実験を行った。

不思議なことに，トリプトファナーゼの活性回復率は実験に使用した変性トリプトファナーゼ試料の蛋白質濃度に強く依存することが実験を行うにつれ明らかとなった（図2 1）。つまり，フォールディング反応を開始させる前の実験条件に実験の最終的な結果が依存するという興味深い結果が得られた。この相関関係は結果の章で述べたようにフォールディング反応中の条件を統一しても解消されず（トリプトファナーゼ濃度：5  $\mu$ g/ml，Gdn-HCl濃度：100 mM；図2 1），またフォールディング反応中に形成されるアグリゲーションの量も変性トリプトファナーゼの蛋白質濃度に応じて変化することが確認された（図2 2）。アグリゲーションがフォールディング反応開始直後（1 1秒以内）に形成されたことと合わせて考えると，このような現象が観測されるのはフォールディング反応開始直後の溶液の微視的状态に原因があるように思われる。即ち，変性中のトリプトファナーゼの濃度が高い場合，フォールディング反応開始直後に変性剤が希釈される速度と蛋白質が希釈される速度との兼ね合いで，変性剤濃度が充分低下してトリプトファナーゼがフォールディングを開始したときに

トリプトファナーゼの濃度が未だ高く、アグリゲーションを形成する中間体が現れると会合してしまうと考えられる。逆に4 M Gdn-HCl中のトリプトファナーゼの濃度が低ければ、変性剤が同じ程度に希釈された時点での蛋白質濃度はより低い値になっているため、アグリゲーションが部分的に抑制され、活性回復率も向上すると考察できる。

トリプトファナーゼの活性回復率はまた実験温度にも強く依存した。図23に示したように、トリプトファナーゼが最も能率良く活性を回復する温度領域は20℃から25℃の間であり、それ以上の温度、またはそれ以下の温度においても活性回復率は低下した。しかし、それぞれのサンプルの温度を25℃に変化させると、10℃でフォールディング反応を行ったサンプルは急激に活性を回復したのに対し、37℃で反応を行ったサンプルでは活性の回復がみられなかったことから、低い活性回復率を示したこの2種類のサンプルは質的に異なっていることが明らかとなった。

蛋白質の高次構造形成反応においては、疎水性相互作用はアグリゲーションなど、反応を阻害する現象を引き起こすが、同時にポリペプチド鎖の三次構造形成やオリゴマー酵素の四次構造形成にも必要不可欠な“分子間力”の一つでもある。分子の疎水性相互作用は温度によって性質の変化する作用の一つであることが知られており、一般に温度上昇と共に非極性の分子が水を排斥する傾向は強まり、逆に低温ではこの傾向が低下するとされている。疎水性相互作用はこのような温度依存的性質を持っているので、10℃においてトリプトファナーゼのフォールディング反応を行うと活性な構造が形成できないほどに疎水性相互作用が弱いために、ネイティブ構造が形成される前の段階でフォールディングが停止すると思われる。この状態から実験系の温度を昇温させると疎水性相互作用の増大と共にフォールディング反応が再開され、図23にみられたように20℃でフォールディング反応を行った場合とほぼ同じ量の分子が活性を持つ構造を形成する。低温でフォールディング反応が停止した状態のトリプトファナーゼ分子の四次構造を同定するために、二架性架橋試薬を用いフォールディング中にトリプトファナーゼのサブユニット同士を共有結合で“結びつけ”て検出しようと試みたが、決定的な結果を得ることはできなかった。しかし、他の研究において補酵素を結合していないアポトリプトファナーゼは、低温において二量体に解離すると報告されている(207)。今回観察したフォールディング反応途中においても、疎水性相互作用が充分でない低温条件下ではトリプトファナーゼの構造形成は活性な四量体構造を形成できず、アポ二量体のような中間状態で停止すると思われる。

一方、37℃におけるフォールディング反応は高温のため非常に疎水性相互作用が強く、トリプトファナーゼの構造形成反応もおそらく素早く進行するが、それ以上にアグリゲーションが形成されやすい環境が形成されていると思われる。従って、37℃における活性を持たないトリプトファナーゼ分子は10℃のそれと異なり、フォールディングを再開できない、アグリゲーションを形成している状態にある。

今回行った様々な実験より、トリプトファナーゼのフォールディング反応は開始直後の環境が結果を大きく左右することが示唆された。そこで、トリプトファナーゼのフォールディング反応の温度依存性、ならびにフォールディング反応開始直後のアグリゲーションと活性回復率の関係を考慮して、アグリゲーションが非常に形成されやすい反応の開始段階において疎水性相互作用を弱めるためにフォールディング反応を低温（0℃）で行い、その後活性構造形成に必要な強い疎水性相互作用を生み出すため37℃に反応温度を昇温させてフォールディング反応を行ってみた。この実験では自発的フォールディング反応で観測された最も高い比活性（27 U/mg）が観測され、同じ反応を一貫して37℃で行う場合よりも約7倍高い値となった。このように、トリプトファナーゼの活性回復率は適当な実験条件の設定によりアグリゲーションを最小限に抑制する処置を施せば、完全に可逆とはいかないまでも以前よりも飛躍的に改良することができた。

トリプトファナーゼの自発的なフォールディング反応を表した模式図を以下に示した（図42）。

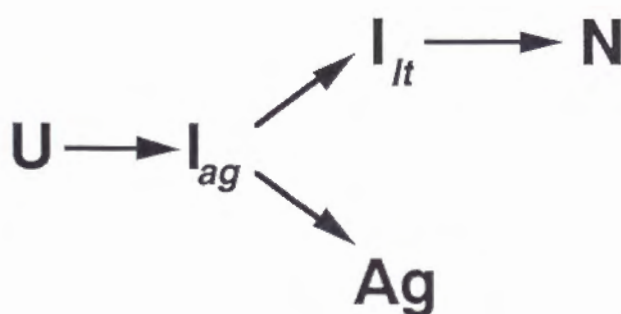


図42. トリプトファナーゼの自発的フォールディング反応。U, 変性状態;  $I_{ag}$ , アグリゲーションを形成しやすい初期の中間状態;  $I_{lt}$ , 低温でフォールディング反応が一旦停止する中間状態; N, ネイティブ状態; Ag, アグリゲーション。フォールディング反応が高温で行われると、図中の $I_{ag}$ が速やかに形成され、速やかにアグリゲーションに移行する。一方で反応を低温で行うと、 $I_{ag}$ が形成された後にアグリゲーションへ進行しにくくなるために、 $I_{ag}$ は次の中間状態 $I_{lt}$ を形成する。この中間状態は低温では最終的なN状態へ移行することはできないが、低温で開始させたフォールディング反応を途中で昇温させると速やかに活性を回復する。



#### 4-C. シャペロニン存在下でのトリプトファナーゼのフォールディング反応

##### 4-C-1. トリプトファナーゼのフォールディング反応に対するGroEの効果 —一般的な考察—

前項ではフォールディング反応初期に形成されるアグリゲーションをフォールディング反応の手順を調節することにより最小限にとどめることができることを証明した。しかし、実際の生体内ではこのようにアグリゲーションが制限される条件にはほど遠い環境（高蛋白質濃度、高温）ではほぼ定量的にトリプトファナーゼのフォールディング反応が進行していることから、生体内にはトリプトファナーゼのフォールディングを補助する因子が存在することが考えられた。そこで本研究ではトリプトファナーゼのフォールディング反応を補助する因子の候補として、同じ大腸菌由来のシャペロニン蛋白質、GroELとGroESの作用を詳細に検討した。

フォールディング反応溶液にGroELとGroES、及びATPが存在しているとトリプトファナーゼの活性回復率は最大80%に向上することが明らかとなった（図24）。活性回復率の増加にはGroELが必須であったことから、シャペロニンの効果発現にGroELが中心的な役割を担っていると考えられた（図26(a)）。一方ではGroESが反応溶液中に添加されなくてもトリプトファナーゼの活性回復率はほとんど変化しなかったことから、トリプトファナーゼのフォールディング反応においてはGroESは必須の役割を担っていないことが明らかとなった（図26(b)）。また、ATP非存在下でGroEL・GroESはトリプトファナーゼのフォールディング反応速度を低下させる効果を発現した（図26(c)）ことより、GroELがフォールディングを行うトリプトファナーゼ分子と直接結合していることが示唆された。このGroELとトリプトファナーゼとの結合はおそらく疎水性相互作用を介して行われていると思われる。本研究においてはこれは、GroELがアグリゲーションを抑制する効果を持った事実（図27）より間接的に導かれた結論であるが、LandryらはGroELとモデルペプチドとの相互作用に関するNMRの研究において、GroELがペプチドを疎水性相互作用を介して結合することを直接観測しており(116)、GroELと標的蛋白質との相互作用が疎水性相互作用を介して行われている可能性はかなり高い。

ATP存在下でGroELが最も強く効果を発現するためには構造を形成するトリプトファナーゼに対し大過剰のGroEL14量体が存在しなければならないことが図25の結果より明らかとなった（15倍量）。このトリプトファナーゼとGroELとの間にみられた量比の問題は他の標的蛋白質でも取り上げられ、それらの結果によるとこの量比は

標的蛋白質によって千差万別であることが明らかになっている。例えば、Rubiscoのフォールディング反応はGroELがRubiscoの3倍量存在する状態で最も効率よく活性を回復する(126)。また、クエン酸合成酵素は6倍量のGroEL存在下でフォールディング反応中のアグリゲーションが完全に抑制されることが報告されている(128)。この量比の差は認識される標的蛋白質のフォールディング中間体の構造的特性が異なるために生まれるものであると考えられ、中間体の分子表面に露出した疎水性領域が小さい場合、またはGroELに認識されやすい中間状態の寿命が短い場合はより多くのシャペロニン分子が溶液中に存在しなければ能率良く標的蛋白質と結合することができず、従って効果も発現されない。このように考えればトリプトファナーゼとGroELとの相互作用は他の標的蛋白質に比べ弱いものであるといえる。

トリプトファナーゼとGroELが結合することにより、アグリゲーションが抑制されるのは次のようなメカニズムによると考えられる。トリプトファナーゼとGroELが疎水性相互作用を介して結合した結果、トリプトファナーゼは反応溶液中の他のトリプトファナーゼ分子と相互作用できなくなり、アグリゲーションを形成する反応から隔離される。トリプトファナーゼ分子の大部分がこのようにGroELによって溶液から隔離されると、溶液中に存在するアグリゲーションを形成しうる分子の濃度は当然激減する。アグリゲーションは一種の会合反応であり、関与する分子の濃度に非常に敏感な現象であるので、このようにGroELが溶液中のトリプトファナーゼ分子の濃度を低下させると、アグリゲーションは有効に抑制されるのである。

トリプトファナーゼがGroELに結合した状態からその後ATPの添加により速やかに活性を回復するが、この段階がシャペロニンの作用機構の中で最も難解な段階であり、今回トリプトファナーゼに関して得られた結果からも断定的なメカニズムを導くことはできなかった。しかし、今回トリプトファナーゼに関して行った一連の実験で観測された興味深い性質、及び化学反応の基礎的な原理をもとに、今後のシャペロニンに関する研究の指針となるような一つの作業仮説を構築するに至った(図43)。前述したように、本研究においてフォールディング反応中に生じるアグリゲーションはGroELとトリプトファナーゼが結合し、トリプトファナーゼのフォールディング中間状態が溶液から隔離されるために効率よく抑制される。この結合反応は、一般的な化学反応と同様に平衡論的、及び速度論的な法則に従って行われるはずである。物理化学的にみると、巨視的に平衡状態にある系の構成分子は微視的にみれば絶えず平衡を構成する状態の間、今回においては結合した状態と解離した状態の間を転移し続けて

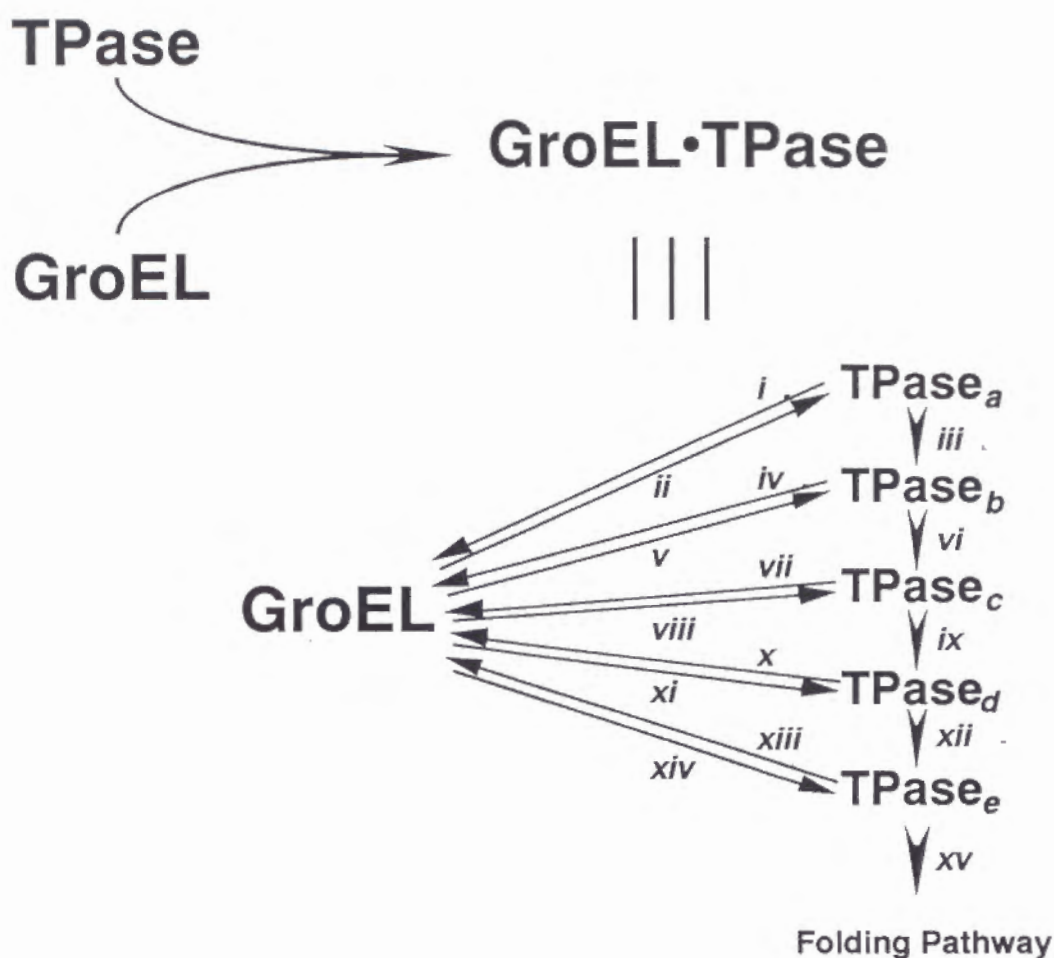


図4 3. 本研究で提唱したシャペロニンの作用機構に関する作業仮説。標的蛋白質はトリプトファナーゼ (TPase) として模式的に示した。反応の流れは図中ローマ字番号 (i~xv) で示した。フォールディング反応中のトリプトファナーゼがGroELにより認識され、結合することによりアグリゲーションが抑制される。この巨視的に観測されるGroEL・トリプトファナーゼ複合体は、微視的に観測すれば個々のトリプトファナーゼがGroELと絶えず結合と解離を繰り返している。GroELと結合している際にはトリプトファナーゼは構造形成が不可能であるが、GroELから解離した状態 (図中TPase<sub>a</sub>からTPase<sub>e</sub>まで) ではトリプトファナーゼ分子は構造形成を行うことができる。一度解離状態を経たトリプトファナーゼ分子 (例: TPase<sub>e</sub>) はその前の分子 (TPase<sub>b</sub>) より構造形成が進行しており、従ってGroELとの親和性も低下している (親和性: TPase<sub>a</sub> > TPase<sub>b</sub> > TPase<sub>c</sub> > TPase<sub>d</sub> > TPase<sub>e</sub>)。最終的にGroELに認識されない分子種が形成され、トリプトファナーゼはフォールディングを完成させる。

いると考えられる。即ち実験的にはGroELがトリプトファナーゼのフォールディング中間状態に結合し、アグリゲーションが抑制されているような状態が観測されるものの、個々のトリプトファナーゼ分子は絶えずGroELと結合した状態と解離した状態の間を行き来していると思われる。ここで注意しなければならないことは、トリプトファナーゼがGroELに結合していない状態、つまり結合・解離反応の解離状態にある時はトリプトファナーゼのフォールディング反応が進行するということである。従ってGroELと一回結合・解離のサイクルを経た後のトリプトファナーゼ分子はサイクル前の



分子よりもごくわずか構造形成が進んでおり、一般的な蛋白質のフォールディング反応を考えれば分子の疎水性がごくわずか低下する事になる。このようなサイクルを経るにつれてやがてGroELに認識されないほど構造を形成したトリプトファナーゼ分子が形成され、その分子は同時にアグリーゲーションを形成する傾向も失ってしまうために正しくネイティブ構造を形成する。この作業仮説をモデル化した図43をみると、GroELと標的蛋白質との結合・解離反応はアグリーゲーションが形成されないために標的蛋白質分子を一時的に蓄える貯留池のような役割を果たしているように感じられる。

上記の作業仮説に従って考えると、シャペロニンの作用機構に関する実験の結果に関して一つの予想を立てることができる。即ち、シャペロニンと標的蛋白質との複合体が安定に存在する条件下（ATP非存在下）でも標的蛋白質のフォールディングは（アグリーゲーションが抑制された状態で）ゆっくりながら進行するはずなので、充分長い時間観測するとネイティブ構造を形成した標的蛋白質が（アグリーゲーションが抑制されるため、自発的フォールディングの場合より高い割合で）出現するはずであると予想される。本研究ではこのような現象が実際に観測され（図26(c)）、この作業仮説を支持する有力な証拠となっている。この予想を更に発展させると、細胞内にはATP非存在下でもGroELのシャペロニン効果が発現される標的蛋白質が存在するということもあり得る。即ち、標的蛋白質のフォールディング速度が充分すばやいものであれば、ATP非存在下のGroELと標的蛋白質の結合解離平衡において解離した状態でフォールディングが進行し易い条件が整ってしまう場合もあるはずである。この時、GroELのアグリーゲーション抑制効果は依然発現されているので、このような標的蛋白質の活性回復率は自発的フォールディングの場合よりも高くなると予想される。このような特殊な標的蛋白質のフォールディングが存在するか否かに関しては以下のPEPCのフォールディング反応におけるGroELの効果に関する項で詳しく考察する。

#### 4-C-2. トリプトファナーゼのフォールディング反応に対するGroEの効果

##### —ヌクレオチドの役割—

GroEの作用機構におけるATP及びGroESの役割は基本的には標的蛋白質のGroELからの解離を促進するものであるという点においては合意されているが、その効果が具体的に発現されている分子機構に関しては研究者の間で意見の分かれるところである。例えば、Rubisco(126)やロダネーゼ(133)のフォールディング反応ではGroEL、GroES、及びATPが必ず存在しなければ進行しないことが解明されており、これらの

標的蛋白質を対象にして実験を行っている研究者はGroEの効果発現には必ず両方のシャペロニン蛋白質存在下でATPが加水分解され、その加水分解により得られるエネルギーが標的蛋白質のGroELからの解離、または標的蛋白質の構造形成に利用されていると主張している。GroELが標的蛋白質と疎水性相互作用を介して結合しているため、何らかの外来エネルギー源がなければこのような相互作用を解消し、標的蛋白質が解離することができないというのがこの説の根拠である。しかしその一方で、DHFR(131)やLDH(141)などの酵素は反応液中にGroESが必要ではなく、ヌクレオチドもATPの他にATP- $\gamma$ -SやAMP-PNPなど、GroELに加水分解されないヌクレオチド類似体存在下でも同じ様な効果が発現されるので、これらの蛋白質を用いて研究している人は必ずしもヌクレオチドの加水分解は必要でなく、ヌクレオチドの結合に伴うGroELの構造変化のみで標的蛋白質は充分解離できると主張している。今回、トリプトファナーゼのフォールディング反応に関しては後者の説を支持するような結果が得られた。

図28に示したように、トリプトファナーゼはATPを添加した場合の他にATP- $\gamma$ -SやAMP-PNPなどのATP類似体を添加した場合でも速やかに活性を回復し、DHFRやLDHと同様、反応においてATPの加水分解を必要としないことが明らかとなった。更に興味深いことに、トリプトファナーゼはGroE存在下でADPを添加した場合にも速やかに活性を回復した。これは、当時報告されていたどの標的蛋白質でも観測されなかった結果であり、GroELのシャペロニン作用におけるヌクレオチドの役割に関して重要な知見を与えるものであった。現在までに報告されている標的蛋白質の性質を、様々なヌクレオチドを添加した際の振る舞いにより分類すると、ATPを添加した場合はこれまでに報告されていたすべての標的蛋白質の速やかな活性回復が観測され、加水分解されないATPアナログを添加した場合はDHFRやLDH、トリプトファナーゼなど、ごく限られた一部の標的蛋白質の活性回復が観測された。そして本研究ではトリプトファナーゼのみ、ADPを添加することにより形成される状態から解離できることが明らかとなった。このように添加するヌクレオチドによって解離が促進される標的蛋白質が異なることはヌクレオチドによってGroELと標的蛋白質との複合体に与える効果が微妙に異なっていることを示唆している。

ADPが反応溶液に添加された結果、GroEとトリプトファナーゼの相互作用にどのような結果を及ぼしているのかを探るために図29、及び図30に示した実験を行った。まず図29の結果より、ATPとは異なりADPは反応中にGroELにより加水分



解されないことが解明され、A D Pが及ぼす効果はGroELへの結合により発現されていることが確かめられた。また、A D Pの効果は濃度依存的であり、A T Pほど有効ではないものの、約85  $\mu$ Mの濃度で効果の50%が発現されることが確認され、A D Pの効果はGroELをとりまく溶液環境を変化させるような非特異的なものではなく、GroEL分子内のある特定の結合部位を介して発現されていることが明らかとなった。結果を総合すると、ヌクレオチドを添加した結果観測されるフォールディング促進の効果はシャペロニンへのヌクレオチド結合により誘発されるGroELの構造変化が関与しているように思われる。A T PやA D Pなどが反応溶液に添加された結果、GroELがかなり大規模に構造を変化させていることがBaneyx と Gatenby によって確認されている(202)。加水分解されないヌクレオチド存在下でのトリプトファナーゼの速やかな活性回復を矛盾なく説明するためにはこのようなヌクレオチド結合に由来する構造変化が標的蛋白質の速やかな解離に密接に関与していると結論せざるを得ない。

GroELのA T Pアーゼ活性、及び本研究で明らかにされた様々なヌクレオチド存在下でのGroELの振る舞いより、GroELが形成しうる様々な状態とトリプトファナーゼのフォールディング反応との関係を以下の図に示した(図44)。

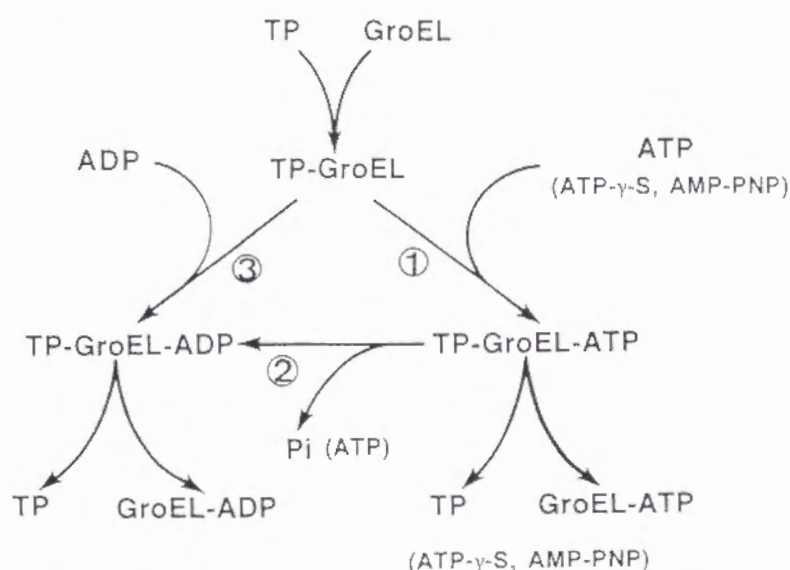


図44. ヌクレオチド添加に応じてトリプトファナーゼのフォールディング反応中にGroELが形成する様々な構造とその相関。TP, トリプトファナーゼ。GroELとトリプトファナーゼが複合体を形成した後、溶液中にA T P, ATP- $\gamma$ -S, またはAMP-PNPが添加されると反応1を経てA T P結合構造を形成する。添加されたヌクレオチドがA T Pの場合のみ、GroELによりA T Pが加水分解され、反応2を経てA D P結合型構造を形成する。本研究の結果、GroELは直接A D Pを結合してこのA D P結合型構造を形成することが明らかとなった(反応3)。トリプトファナーゼに関してのみ、直接反応3から形成されるA D P結合型構造が形成されるとGroELから解離することができる。

Rubiscoなど、GroES及びA T P存在下でのみ活性を回復するような標的蛋白質はこの



図の経路1及び2, 即ちATPの加水分解反応を経て構造を形成する。DHFRやLDHはこの図に示した反応1, 即ちATPもしくはその構造類似体の結合により活性構造を形成できるようになる。最後に, トリプトファナーゼはこの図に示した経路1または3, つまりATPまたはADPのいずれかの結合により活性を持つ構造を形成できるようになる。

その後, トリプトファナーゼ以外にも7種類の標的蛋白質, 即ち酵母由来のエノラーゼ(145), 大腸菌由来のグルタミン合成酵素(208), *Bacillus stearothermophilus* (209)及び*Staphylococcus*種(137)由来のLDH, *Thermus* 種由来のMDH(137), *Bacillus* 種由来のグルコース脱水素酵素(137), そして*Aspergillus oryzae* 由来のタカアミラーゼA(137)についてもほぼ同様にADP存在下で活性を回復することが報告され, この結果の一般性が証明された。興味深いことに, これらの標的蛋白質はすべてトリプトファナーゼとは異なり, ADPを添加した場合, 同時にGroESも反応液中に存在していなければ効果が発現されないことが明らかになり, 上記のGroELの構造遷移のメカニズムにGroESも密接に関与しうることが強く示唆された。

先の項に述べた, 本研究において構築した作業仮説とあわせて考えると, 反応溶液中にATPなどのヌクレオチドを添加すると, ヌクレオチドの結合に伴い, トリプトファナーゼとGroELとの間の相互作用が弱まって, 結合解離平衡は標的蛋白質を解離させる方向へと傾くのではないかと思われる。結合解離平衡が解離方向へ傾けば, 溶液中の標的蛋白質の量は増加し, その分フォールディング反応が進行しやすいために, 速やかな活性の回復が観測されるようになると考えれば本研究を含めた様々な実験結果を説明することができる。ただし, このような仮説には一つ, 非常に大きな問題が存在する。即ち, ヌクレオチド結合に伴い, GroELと標的蛋白質との相互作用が弱まり, 溶液中の標的蛋白質の濃度が増加すれば, 必然的にアグリゲーションも形成されやすくなる。つまり, 標的蛋白質が最も能率良くフォールディングを行うためにはフォールディングの進行とアグリゲーションの抑制という相反する条件が同時に満たされるちょうど良い環境が形成されなければならない。第一にこのような状態が必ず存在する保証もない。更に, 前述した通り, 大腸菌内においてGroELは細胞内で発現されている蛋白質の約5割と相互作用していることが明らかになっており, これらの標的蛋白質はすべて特有のフォールディング反応を経て構造形成を行っていると思われる。とすれば, GroELはいったいどのようなメカニズムで, これらの標的蛋白質一つ一つのフォールディング反応を速やかに進行させ, しかもアグリゲーションを能率良く

抑制し続けるためのちょうどよい溶液環境を作り出しているのか、という大きな疑問が残る。一つのシャペロニン蛋白質が、何百種の標的蛋白質のフォールディング反応に対応しながら活性回復を補助するというこの謎はシャペロニン効果の分子メカニズムの本質に関わる非常に重要な問題であり、今後特にGroELと標的蛋白質との相互作用に関するより詳細な研究、及びGroELの作用を補助するとされるGroESの役割を解明するための研究より次第に明らかになっていくと思われる。

#### 4-D. GroELの変性反応

シャペロニンの作用機構を観測するにあたり、今後はGdn-HClなどの化学変性剤により変性させた標的蛋白質のフォールディング反応に関する研究ばかりではなく熱変性現象、酸変性現象にも注目して様々な研究を進めなければならないことが予想された。この際問題になるのは標的蛋白質をフォールディングさせるような条件下で、GroEL自身のシャペロニン活性が失われないことを確認しなければ、実験結果の解釈に問題が生じることである。そこで、今後行う研究の前段階として、様々な条件下におけるGroELの構造安定性を確かめることにした。

図32に示した実験においてまずGroELの熱安定性を活性測定により調べた。GroELは短時間の熱処理に対する耐性は非常に高く、70℃においてもATPアーゼ活性がほぼ5割保持されることが確認された。この結果とGroELの熱ショック蛋白質としての性質をあわせて考えると、生体内においてはGroEL蛋白質はほとんどすべての蛋白質が熱により失活するような条件下でも充分活性を保持することが確認された。

次に、Gdn-HClに対する構造の安定性を確認するために様々なGdn-HCl濃度中でのGroELの構造変化を蛍光スペクトルの測定により追跡した。GroELの変性反応に観測された最初の特徴は、GroELがあらゆるGdn-HCl濃度中でトリプトファナーゼのようにアグリゲーションを形成することはなかったことであった(図33(b))。それぞれのGdn-HCl濃度中でGroELが50  $\mu$ g/mlという比較的高い蛋白質濃度にあったにも関わらず、アグリゲーションの指標となる光散乱強度の変化を観測すると、どのサンプルもネイティブ状態の光散乱強度以上の値を示すものはなかった。GroELが様々な標的蛋白質と疎水性相互作用を介して結合することを考えればこの結果はいささか不思議なものではあったが、トリプトファナーゼのように変性中に広範囲にわたる疎水性部位が安定に存在しなければ、アグリゲーションが形成されない場合もあり得る。一方で、予備実験において完全に変性させたGroELをネイティブ状態に回復させようと試みたと



ころ、活性の回復はほとんど観測されず、またフォールディング反応中にアグリゲーションに由来する光散乱強度の変化が観測された。従って、GroELは変性状態からフォールディングを開始させる際の急激な変性剤濃度の変化には非常に敏感であると考えられた。この実験結果に対する一つの解釈としては、GroELのフォールディング反応においてはあまりに急激な構造の形成はポリペプチド鎖の誤ったフォールディングを引き起こし、これら誤ったフォールディングを行った分子がその後アグリゲーションを形成するのではないかというものである。この解釈が正しければ、トリプトファナーゼと同様、GroELのフォールディング反応についても充分条件を検討すれば効率の良いフォールディング反応が可能であるかもしれない。

GroELの変性反応を観測して明らかになったもう一つの重要な知見はGroELの変性中間状態に関するものである。GroELはネイティブ状態と変性状態の他に少なくとも一つの中間状態を形成しうることが明らかとなった（図33）。励起波長278 nm、蛍光測定波長308 nmにおける蛍光強度の変化よりこの中間状態は0.5 M Gdn-HCl以下の変性剤中で形成され、0.5 M Gdn-HClから1.0 M Gdn-HClの間で安定に存在することが明らかとなった。同時に測定した光散乱強度の変化より、この中間状態はネイティブ状態よりやや小さい分子半径を持ち、この結果はGdn-HCl存在下でのGroELのHPLC ゲル濾過分析の結果によっても支持された。

その後の実験よりこの中間状態に関する情報が更に得られた。ANS 存在下での蛍光スペクトル測定によりこの中間状態はネイティブ状態に比べて分子表面に疎水性領域が多く露出していることが明らかとなった（図35）。これらの結果はGroEL 14量体の解離によってサブユニット会合に関与する疎水性部位が露出している状態を反映していると考えられるが、あるいはGroELの14量体構造は保たれたまま、標的蛋白質を認識する結合部位近傍などの微小な構造変化により本来分子表面に現れない疎水性部位が露出したことを反映しているとも考えられる。HPLC 分析により得られた結果を重視すれば、GroELが14量体から7量体に解離していると考え難く、また、GroELの濃度を変化させて同様の実験を行っても結果に変化はなかったことから、この中間状態はサブユニットの解離に関与したものであると考えることは困難であった。その一方で、GroELの変性反応をCDスペクトル変化で観測するとこの中間状態はネイティブ状態とほとんど変わらない量の二次構造を保持していることが明らかとなり（図34）、GroELの分子の一部が選択的に構造を失っているという説明も少々難点が残る。更に考慮に入れなければならないことは、この中間状態が形成される条件は



これまでにトリプトファナーゼ(152)やエノラーゼ(145)に関して当研究室においてフォールディング反応を解析した条件に相当することである。即ち、この中間状態が出現する条件下ではGroELは未だにシャペロニン活性を保持しているという、非常に重要な知見を解釈に含めなければいけない。そこで、現時点ではこのGroELの中間状態を、ネイティブ状態に非常に似た状態N'と定める。N'はネイティブ構造と同じ14量体構造を保持し、ネイティブ状態よりは分子の表面に疎水性領域が露出され、シャペロニン活性を発現することができる様な構造である。分子表面に疎水性部位が露出している点などを考慮すると、このN'構造はあるいはシャペロニン活性の発現に重要な構造であるかもしれない。今後は、フォールディング反応溶液中のGdn-HCl濃度を変化させ、その中でGroELが効果を発現するメカニズムに関して、本研究で行ったよりもより詳細な、しかもより構造的側面に注目した研究を行わなければならない。

#### 4-E. シャペロニン存在下でのPEPCのフォールディング反応

4-C-1. においてシャペロニン蛋白質の作用に関する作業仮説を提唱したが、この作業仮説をもとに、標的蛋白質の中にはATP非存在下においてGroELのアグリゲーション抑制効果を受け、速やかな活性回復を見せるようなものが存在すると予想した。そこで、このような標的蛋白質が実際に存在するかどうかを確認するため、様々な標的蛋白質に対しGroELを作用させ、その中から大腸菌由来PEPCを候補として選択した。

PEPCはサブユニット分子量においてトリプトファナーゼの約2倍の分子量を持ち、これまでに報告されている標的蛋白質の中でも最大級のオリゴマー蛋白質であった。この酵素の変性反応はほぼ不可逆であり、6 M Gdn-HCl中での完全変性状態からの自発的な活性回復率は10%以下という、非常に低い値であった。予備実験において25℃で行ったPEPCのフォールディング反応中にGroE、及びATPを添加したが、添加の効果は全く観測されなかった。PEPCのフォールディング反応はアグリゲーションにより制限されていることはあらかじめ光散乱強度の測定により確認されていたので、PEPCのフォールディング反応においてGroEが効果を示す可能性は充分あるが、フォールディング中の条件がGroELとPEPC中間体の複合体形成に不適当なものであると判断した。GroELがPEPCと相互作用できない理由としては、疎水性部位が分子表面に露出していないこと、あるいはアグリゲーションが形成される速度があまりにも速いためにGroELが結合する前にアグリゲーション形成が完了していることなどが考えられ

た。PEPCの自発的フォールディング反応においてアグリゲーションが確認されていたので、分子表面に疎水性領域が露出していないとは考えにくかった。そこで、トリプトファナーゼのフォールディング反応に関する実験結果を考慮し、PEPCとGroELが相互作用するであろうフォールディングの初期反応をアグリゲーションが形成されにくい低温条件下で行うことにした。

0℃、GroEおよびATP存在下でPEPCは自発的フォールディング反応の約2倍の活性回復率を示した。その後反応液を25℃に昇温させると最終的には25%の活性回復率を示した(図36)。このことよりGroELとPEPCとの最初の複合体形成さえ能率良く進めばGroE添加のアグリゲーション抑制効果が働くことが明らかとなった。低温でフォールディング反応を行うに当たって一つ問題になり得たことは、低温での疎水性相互作用の低下のためにPEPCとGroELが結合できなくなることであったが、図36の結果に示したように、PEPCは低温でも充分GroELと結合できることが示された。

この効果の性質を更に調べるために、トリプトファナーゼの場合と同様GroEの構成因子を選別的に実験系から排除することにより、排除された因子の役割を明らかにしようとした。この実験で、極めて興味深いことにATP非存在下でPEPCをGroELと作用させた方が、ATP存在下で作用させるより約10%活性回復率がよいことが明らかとなった(図36)。これはATP存在下ではPEPCがGroELより速やかに解離するため、溶液中のPEPCの濃度が上昇し、それに伴いアグリゲーションが形成されると考察することができた。

ATP非存在下で得られたこの高い活性回復率を指標に、PEPCとGroELが相互作用するフォールディング反応初期の条件検討をより詳細に行った結果、様々な事実が明らかとなった。まず、図37の結果より、PEPCがGroELと能率よく結合するためにはフォールディング反応が0℃で開始されればよいことが明らかとなった。この結果は、GroELとPEPCが結合するために要する時間が非常に短いことと、PEPCが不可逆的なアグリゲーションを形成する反応は、トリプトファナーゼと同様フォールディング反応初期のごく短い時間内に完了したことを示唆していた。また、PEPCとGroELとの結合は、フォールディング反応を開始する温度にも強く依存し、高温でフォールディング反応を開始するほどPEPCとGroELが複合体を形成しないことが明らかとなった。このような実験結果は、PEPCのフォールディング反応において、アグリゲーション形成の反応、もしくはその前段階の、アグリゲーションを形成しうるPEPC中間状態の形



成反応の速度が低温にてGroELとPEPCとの複合体形成反応速度よりも遅くなっているために観測されたと考えられる。

PEPCのフォールディング反応に及ぼす効果はアグリゲーション抑制の効果のみに限られることは図39の結果より明らかとなった。この実験では、PEPCがGroELから解離した後のフォールディング反応に関する実験であるが、フォールディング反応を0℃で開始させても、昇温する温度が高ければ高いほど活性回復率が低下することが明らかとなった。これは、PEPCがGroELから解離した後も、アグリゲーションを形成する傾向を保持していなければ観測されない実験結果である。他の研究で提唱されているように、もしGroELとPEPCが結合した結果PEPCのフォールディング反応がGroELにより積極的に補助されるならば、GroELから解離したPEPCはアグリゲーションを形成する性質を失っているはずなのでむしろ疎水性相互作用が強い高温の方がPEPCの活性回復率が高くなるはずである。しかし、このように温度上昇に伴い、PEPCの活性回復率が低下しているということは、GroELから解離した段階のPEPCの構造は未だにアグリゲーションを形成する傾向を強く持っていることを示す。

シャペロニン存在下でのPEPCのフォールディング反応において、最も興味深い結果はやはりATPを添加した際のフォールディング反応の変化であった。このフォールディング反応におけるアグリゲーションの形成の有無を確かめるためにPEPCのフォールディング反応中の光散乱強度の変化を観測した。図40に観測されたように、PEPCは自発的フォールディング反応中、及びシャペロニン存在下でフォールディング反応を一貫して25℃で行った場合は非常に高い光散乱強度を示し、PEPCのアグリゲーションが抑制されていないことが明らかとなった。しかし、同じ濃度のシャペロニン存在下で、フォールディング反応を0℃で開始させるのみで、PEPCのアグリゲーションはほぼ完全に抑制された。このアグリゲーションが抑制された反応溶液にATPを途中添加したところ、直ちにアグリゲーション形成を示唆するような急激な光散乱強度の上昇が観測された。図39の実験結果とあわせて考えると、ATPを添加することによりGroELに結合し、アグリゲーションから守られていたPEPCのフォールディング中間状態が溶液中に放出され、放出されたPEPC分子はアグリゲーションを形成する性質を失っていなかったために、直ちにアグリゲーションを形成したと思われる。これはまさに、4-C. で提唱した、GroEL・標的蛋白質に対するヌクレオチド添加の効果（結合解離平衡を解離状態へ傾ける効果）を直接証明するような実験結果であった。結果的には、PEPCのフォールディング反応においてはATPを添加した場合

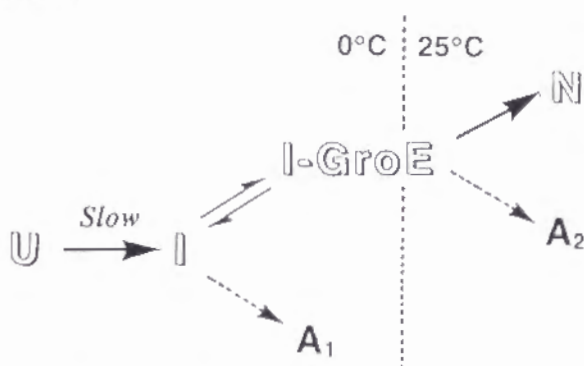


のGroELの構造変化はむしろアグリゲーション形成を促進し、PEPCの活性回復率が最も高い値を示すのはヌクレオチド非存在下でGroELからPEPCが徐々に解離し、フォールディングする状態が最も良かったと結論づけられる。

•25°C



•0°C ➤ 25°C



•0°C ➤ 25°C (+ATP)

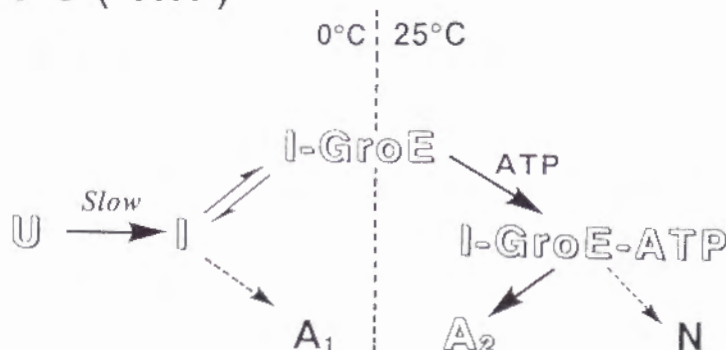


図45. GroEL存在下でのPEPCのフォールディング反応。各条件の主要な反応経路は中抜き文字で記した。一貫して25°Cで反応を行った場合、フォールディング反応初期の中間体Iの形成とアグリゲーションの形成(A<sub>1</sub>)は非常に速く進行するために、溶液中にGroELが存在していても能率良く複合体を形成することはできない。そこで反応温度を0°Cに低下させると変性状態からIの形成反応、またはIからA<sub>1</sub>への反応が遅くなるために、GroELがPEPCを認識することが可能になり、アグリゲーションが抑制される。その後、反応温度を25°Cに変化させるとPEPCはGroELから速やかに解離し、ネイティブ状態Nを形成する。この際溶液の温度を25°C以上に昇温させるとGroELから解離したPEPCフォールディング反応中間体はアグリゲーションを形成する性質を保持しているので活性回復率が低下する。フォールディング反応を0°Cで開始し、その後25°Cに上昇させる手順を踏んでも、溶液中にATPが存在する場合は溶液中へのPEPCの放出量は多くなり、再びアグリゲーションが形成されやすい状態に戻る。

本研究で明らかとなったPEPCのフォールディング反応におけるGroELの効果をまとめた模式図を図45に示した。高温でフォールディング反応を開始すると、PEPCは極めて速い速度でフォールディング・アグリゲーション形成へ進行するため、25℃においてGroELの添加効果はみられない。しかし、フォールディング反応、あるいはアグリゲーション形成反応のどちらかの速度を温度低下により減少させると、GroELとPEPCのフォールディング中間体は結合することができる。GroELがPEPCのフォールディングを高い効率で抑制することができるのはあくまでも低温条件下のみで、反応溶液の温度を25℃に上昇させるとPEPCは徐々にGroELから解離し始める。しかし、この条件下でも大部分のPEPC分子はGroELに結合しているので、アグリゲーションは形成されない。結果的にGroEL存在下、ATP非存在下で行うPEPCのフォールディング反応は自発的フォールディング反応よりも高い活性回復率を示す。この系にATPを途中添加すると、PEPC分子の溶液中の濃度が急激に上昇し、GroELから解離したPEPC分子は未だにアグリゲーションを形成する性質を持っているので、アグリゲーションを形成する。従って、本来GroELが最も能率良く活性を回復させるはずのヌクレオチド存在下でのフォールディング反応は、PEPCにとってはむしろ逆効果を示す。

PEPCのフォールディング反応は、これまでに報告された様々な標的蛋白質の中でも極めて特殊なものであるといわざるを得ない。ATP非存在下でフォールディング反応を行った方が活性回復率が高い蛋白質は未だに報告例がなく、そもそも25℃でGroELと相互作用することが不可能な標的蛋白質も前例がない。生体内においてはこの蛋白質がどのようにフォールディング反応を完了しているのかは、非常に興味のわく問題である。一つの可能性は、GroELシャペロニン系だけの影響を受けているわけではないという説明である。大腸菌内にはGroEシャペロニン系の他に、DnaK, DnaJ, GrpEから成るHsp70シャペロン系が存在する。最近の研究においてHsp70シャペロン系はGroEシャペロニン系と協同的に作用している知見が報告されている(210)。Hsp70系のDnaKおよびDnaJが構造を失った蛋白質に結合し、これを安定化した後に、GrpEの作用によりこの標的蛋白質をGroE系に引き渡すという系が存在することが示唆されている。PEPCも実際の生体内ではまずHsp70系に安定化された後にGroEの補助を受けて活性構造の形成を完了している可能性は決して低くない。

#### 4 - F. GroEの作用機構・総論

本研究において、大腸菌由来のシャペロニン蛋白質GroEに関して得られた知見は以下のようにまとめられる。

1. GroEを構成するサブユニット分子量6万の14量体蛋白質GroELは標的蛋白質がフォールディング反応中に形成する構造中間体を認識し、結合する。標的蛋白質とGroELとの結合は主に分子の疎水性相互作用を介して行われる。
2. GroELと結合することにより標的蛋白質は正しいフォールディングを阻む不可逆的なアグリゲーションから守られる。これは、GroELと結合した標的蛋白質が溶液中の他の標的蛋白質分子から保護され、その結果アグリゲーションを形成する蛋白質分子の濃度が低下するために現れる効果であった。
3. GroEL・標的蛋白質複合体にヌクレオチドを添加すると、ヌクレオチドはGroELのある特定の部位に結合し、その結果GroELの構造にある種の構造変化が引き起こされる。ヌクレオチドがATPである場合は、この際にATP加水分解反応が起きるが、ADPなど、GroELに加水分解されないヌクレオチドが添加された場合においても同様の効果が観測される。この事実から、ヌクレオチドがGroELの構造に及ぼす効果はヌクレオチド加水分解ではなく、ヌクレオチドの結合により誘発されることが明らかとなった。
4. GroELと標的蛋白質との間に形成された複合体にATPなどのヌクレオチドを添加すると、ヌクレオチドはGroELに結合し、その結果GroELと標的蛋白質との相互作用が変化する。相互作用が変化した結果、標的蛋白質とGroELは解離しやすくなり、解離した標的蛋白質はフォールディング反応を再開する。この際、任意の時間において溶液中に存在する標的蛋白質の濃度はGroELの作用により極めて低いために、標的蛋白質はアグリゲーションを形成することなく正しい構造、ひいては活性を回復する。

このような一連の実験成果をある統一的な分子メカニズムに統合しようとして、本研究では一つの作業仮説を提唱した。この仮説の根底には、GroELと標的蛋白質との結合・解離反応は化学反応が平衡状態にある時の基本原理と、蛋白質のフォールディング反応に限定されたある特徴がある。即ち、GroELと標的蛋白質が互いに結合している平衡状態において任意の標的蛋白質は解離状態から結合状態へたえず移り変わっており、解離状態にある標的蛋白質はフォールディングを進めることができると考え



た。本研究では、この作業仮説を支持する結果が二種類の標的蛋白質について得られた。トリプトファナーゼのフォールディング反応においてGroEL存在下、ATP非存在下でトリプトファナーゼの活性が緩やかに回復する様子が観測されたのは、トリプトファナーゼがGroELと結合を繰り返している状態でも、各々トリプトファナーゼ分子は結合解離平衡の解離状態中にフォールディングを進めていたためであると考えられた。更にPEPCに至っては、ヌクレオチドが存在しない、他の標的蛋白質に関してはフォールディングを抑制する条件がむしろヌクレオチド存在下において形成される環境よりも正しいフォールディングを行うのに適していることが明らかとなった。現時点では、この作業仮説は実験結果に合致しており、今後研究を進める上での有効な指針になりうると思われる。

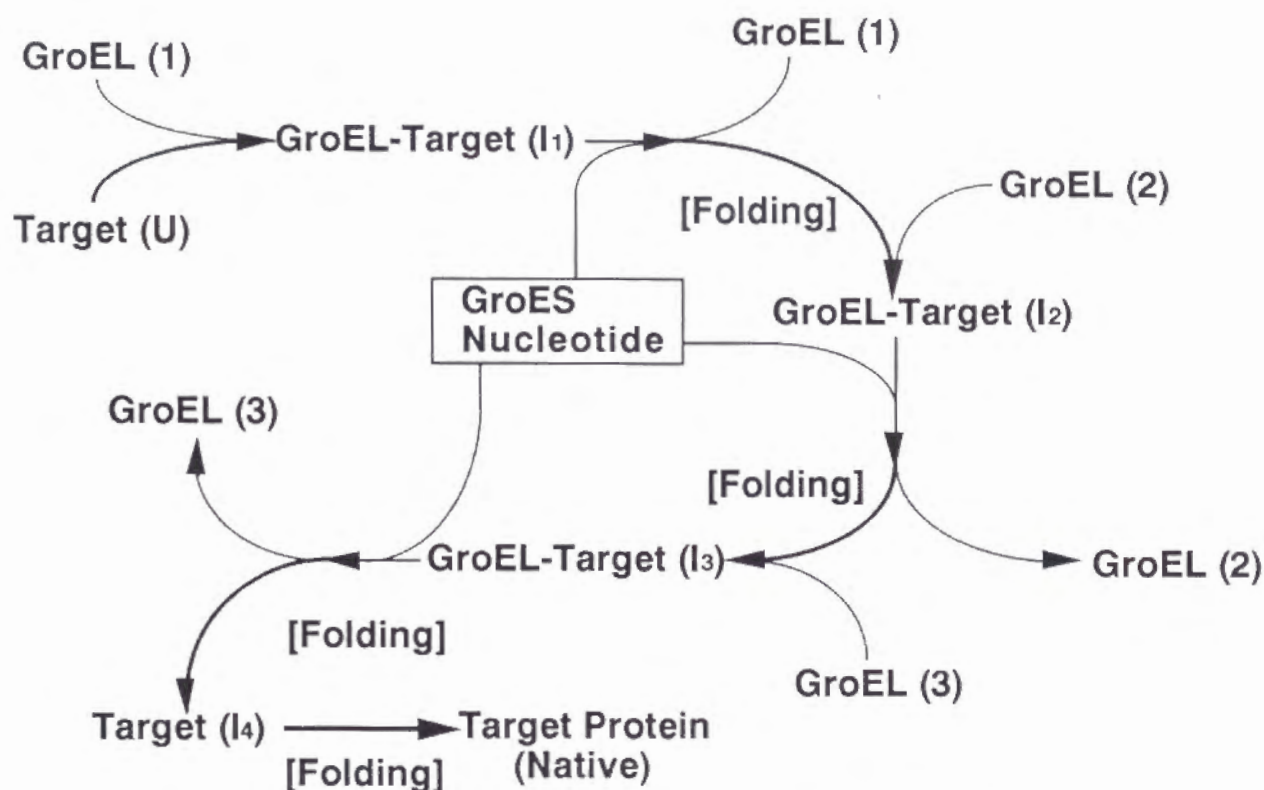


図4 6. GroEL・GroESの作用機構をまとめた概念図。複数の研究成果に対し最も矛盾なく、しかも必要最低限の仮定を用いて構築したものであるが、このモデルを用いても現在までに報告されている実験結果を完全には説明し切れない。また、Martinらが示したような(157)、細胞内における平常状態とされるGroEL・GroEL複合体から出発すると図が極めて難解になるため、あえて省略し、反応がGroEL単体より始まるように記した。各段階で標的蛋白質と結合するGroEL分子がすべて異なる分子であることを表すために番号を記してある。便宜上このモデルでは標的蛋白質は3回GroELとの結合解離を繰り返すように記したが、実際の回数は標的蛋白質の性質により変動すると思われる。太い矢印で示した過程においては標的蛋白質はGroELから解離し、構造を形成することができる。

本研究で明らかになった知見をもとに構築したGroEの作用機構に関するモデルを図4-6に示した。GroELはまず標的蛋白質（Target）のアグリゲーションを形成しやすい中間状態と結合する。GroELに結合した標的蛋白質（GroEL-Target ( $I_n$ ))は他の分子との相互作用を妨げられ、アグリゲーションから保護される。ATPならびにGroESの添加により、GroELから標的蛋白質の活発な解離が起きる。解離した標的蛋白質はすぐ別のGroEL分子に結合するが、この解離しているわずかな間において構造形成は進行するため（図中の太い矢印）、次のGroEL分子に結合した際はほんのわずか、GroELに対する親和性が小さい構造中間体として結合する（図中では中間状態Iに記した番号が増加するにつれGroELとの親和性が低下している）。何回もこのサイクルを繰り返すにつれ、次第に構造形成が進み、GroELとの親和性が低下して、やがてGroELとの相互作用ができない構造、アグリゲーションを生じる性質を失った構造を形成した後（ $I_4$ ）、最終的なネイティブ構造を形成する。この一連のサイクルが行われている間、任意の時点では大部分の標的蛋白質分子はGroELに結合した状態にあると思われ、その結果溶液中に単独で存在している標的蛋白質の濃度は極めて低い。これにより、非常に濃度依存性の高いアグリゲーションはフォールディングが進行する中で抑制され続けると考えられている。

今後の研究においては図4-6に示した作用機構で詳細に記述していない因子の詳細な役割を解明していく必要がある。GroELと標的蛋白質との相互作用に関する微視的な反応機構や、ATPなどのヌクレオチドの結合に伴うGroELの具体的な構造変化と、標的蛋白質との相互作用に及ぼす効果の詳細など、検討されなければならない過程は依然として山積している。中でも、GroE複合体を形成するGroES蛋白質の正確な役割は、これまで世界中の数多くの研究者が解明しようと試みているにも関わらず依然として完全には理解されていない。今後シャペロニンの作用機構は、これらの解明されていない様々な問題点を、特に分子レベルでの相互作用に注目して解析することを目指した研究によって、徐々に明らかにされていくと思われる。

## § 謝辞

本研究は、様々な先生方、諸先輩・後輩方に実験上の便宜並びに御指導を賜り、初めて成し遂げられたものであります。京都大学ウイルス研究所の秋山 芳展博士、伊藤 維昭教授には、本研究の基礎である大腸菌由来GroE遺伝子を含んだプラスミド pKY206を提供していただきました。深く御礼申し上げたいと思います。京都大学化学研究所の左右田健次教授には御所蔵のCD測定装置を使用させていただきました。ここに感謝いたします。

日々の実験の指導はすべて現鳥取大学工学部助教授の河田 康志先生に賜りました。言葉では言い表せないほど感謝いたしております。また、京都大学在学中には現・京都大学農学部教授の泉井 桂先生、並びに現在大阪工業技術研究所にいらっしゃいます湯元 昇先生に様々な実験に関する御指導を賜りました。ここに深く感謝します。

本研究はまた数多くの後輩の助けを借りて行ったものであります。大阪大学在学中の久保 武一氏には特に、本研究の初期に様々な実験の手伝いを行っていただきました。PEPCのフォールディング反応に関する予備実験は主に二人の女性、現・大阪市立工業研究所の渡辺 嘉さんと現・島津テクノリサーチの田中 亜紀さんに行っていただきました。このほか、京都大学在学中にお世話になりました諸先輩・後輩方に深く感謝いたしたいと思います。

申請者は幸いにも数多くの指導教授に恵まれました。まず現在申請者の出身研究室の教授でおられます井上 丹先生には、申請者が研究室を離れるまでのごく短い時間の中でも生物化学の研究、並びに科学全般に対するものの考え方を色々と御指導いただきました。深く感謝いたします。また、申請者が大学院に在籍中、京都大学化学教室の鈴木 仁美教授、並びに郷 信廣教授には生物化学研究室の指導教授を御兼任していただき、申請者の研究も見守っていただきました。改めてここに感謝いたしたいと思います。また、現在申請者が所属している鳥取大学工学部の永井 純教授には御指導を賜るとともに、申請者が学位申請の準備にかまけて通常の実験業務を怠った時にも大目に見ていただきました。お詫びを申し上げるとともに感謝いたしたいと思います。

最後になりましたが、本研究半ばで急逝されました故徳重 正信先生の御冥福を祈るとともに、申請者に生物化学に関する研究のおもしろさを初めて紹介していただいたことを深く感謝いたしたいと思います。



## § 参考文献

- (1) Crick, F. (1970) *Nature* **227**, 561-563.
- (2) 徳重 正信 (1988) UP Biology シリーズ “酵素の働き”, p.15.
- (3) Hamaguchi, K. (1992) "The Protein Molecule -Conformation, Stability, and Folding-", Japan Scientific Societies Press/Springer Verlag, Tokyo.
- (4) Richardson, J. S. (1981) *Adv. Protein Chem.* **34**, 167-339.
- (5) Kendrew, J. C., Dickerson, R. E., Strandberg, B. E., Hart, R. G., Davies, D. R., Philips, D. C., & Shore, V. C. (1960) *Nature* **185**, 422-427.
- (6) Brandon, C., & Tooze, J. (1991) "Introduction to Protein Structure", pp. 47-48, Garland Publishing, New York.
- (7) Kim, P. S., & Baldwin, R. L. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 459-489.
- (8) Kim, P. S., & Baldwin, R. L. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 631-660.
- (9) Matthews, C. R. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 653-683.
- (10) Anfinsen, C. B. (1973) *Science* **181**, 223-230.
- (11) Tanford, C. (1969) *Adv. Protein Chem.* **24**, 1-95.
- (12) Schellman, J. A. (1978) *Biopolymers* **17**, 1305-1322.
- (13) Karplus, M., & Weaver, D. L. (1976) *Nature* **260**, 404-406.
- (14) Garel, J. -R., & Baldwin, R. L. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3347-3351.
- (15) Brandts, J. F., Halvorson, H. R., & Brennan, M. (1975) *Biochemistry* **14**, 4953-4963.
- (16) Schmid, F. X. (1989) in "Protein Structure: A Practical Approach", pp. 251-285, IRL Oxford University Press, Oxford.
- (17) Udgaonkar, J. B., & Baldwin, R. L. (1988) *Nature* **335**, 694-699.
- (18) Houry, W. A., Rothwarf, D. M., and Scheraga, H. A. (1994) *Biochemistry* **33**, 2516-2530.
- (19) Kuwajima, K., Yamaya, H., Miwa, S., Sugai, S., & Nagamura, T. (1987) *FEBS Lett.* **221**, 115-118.
- (20) Kuwajima, K., Sakuraoka, A., Facki, S., Yoneyama, M., & Sugai, S. (1988) *Biochemistry* **27**, 7419-7428.
- (21) Chaffotte, A. F., Guillou, Y., & Goldberg, M. E. (1992) *Biochemistry* **31**, 9694-9702.
- (22) Goldberg, M. E., Semisotnov, G. V., Friguier, B., Kuwajima, K., Ptitsyn, O. B., & Sugai, S. (1990) *FEBS Lett.* **263**, 51-56.
- (23) Chaffotte, A. F., Cadieux, C., Guillou, Y., & Goldberg, M. E. (1992) *Biochemistry* **31**, 4303-4308.
- (24) Kiefhaber, T., Schmid, F. X., Willaert, K., Engelborghs, Y., & Chaffotte, A. (1992) *Protein Sci.* **1**, 1162-1172.

- (25) Roder, H., Elove, G. A., & Englander, S. W. (1988) *Nature* **335**, 700-704.
- (26) Lu, J., & Dahlquist, F. W. (1992) *Biochemistry* **31**, 4749-4756.
- (27) Sugawara, T., Kuwajima, K., & Sugai, S. (1991) *Biochemistry* **30**, 2698-2706.
- (28) Radford, S. E., Dobson, C. M. & Evans, P. A. (1992) *Nature* **358**, 302-307.
- (29) Dolgikh, D. A., Gilmanshin, R. I., Brazhnikov, E. V., Bychkova, V. E., Semisotnov, G. V., Venyaminov, S. Yu., & Ptitsyn, O. B. (1981) *FEBS Lett.* **136**, 311-315.
- (30) Kuwajima, K., Nitta, K., Yoneyama, M., & Sugai, S. (1976) *J. Mol. Biol.* **106**, 359-373.
- (31) Kuwajima, K. (1977) *J. Mol. Biol.* **114**, 241-258.
- (32) Ohgushi, M., & Wada, A. (1973) *FEBS Lett.* **164**, 21-24.
- (33) Goto, Y., Calciano, L. J., & Fink, A. L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 573-577.
- (34) Goto, Y., Takahashi, N., & Fink, A. L. (1990) *Biochemistry* **29**, 3480-3488.
- (35) Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas, A. F., & Gilmanshin, R. I. (1991) *Biopolymers* **31**, 119-128.
- (36) Touchette, N. A., Perry, K. M., & Matthews, C. R. (1986) *Biochemistry* **25**, 5445-5452.
- (37) Kuwajima, K., Mitani, M., & Sugai, S. (1989) *J. Mol. Biol.* **206**, 547-561.
- (38) Matouschek, A., Kellis, J. T., Jr., Serrano, L., & Fersht, A. R. (1989) *Nature* **340**, 122-126.
- (39) Serrano, L., Sancho, J., Hirshberg, M., & Fersht, A. R. (1992) *J. Mol. Biol.* **227**, 544-559.
- (40) Horovitz, A., Matthews, J. M., & Fersht, A. R. (1992) *J. Mol. Biol.* **227**, 560-568.
- (41) Jaenicke, R. (1987) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **49**, 117-237.
- (42) Chothia, C. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 537-572.
- (43) Jaenicke, R., & Rudolph, R. (1989) in "Protein Structure: A Practical Approach" , pp. 191-223, IRL Oxford University Press, Oxford.
- (44) Voet, D., & Voet, J. G. (1990) "Biochemistry" , p. 926, John Wiley & Sons, New York.
- (45) *ibid*, p.5.
- (46) Fischer, G., & Schmid, F. X. (1990) *Biochemistry* **29**, 2205-2212.
- (47) Gething, M. -J., & Sambrook, J. (1992) *Nature* **355**, 33-45.
- (48) Schreiber, S. T. (1991) *Science* **251**, 283-287.
- (49) Takahashi, N., Hayano, T., & Suzuki, M. (1989) *Nature* **337**, 473-475.
- (50) Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., & Schmid, F. X. (1989) *Nature* **337**, 476-478.
- (51) Lang, K., Schmid, F. X., & Fischer, G. (1987) *Nature* **329**, 268-270.
- (52) Harding, M. W., Galat, A., Uehling, D. E., & Schreiber, S. L. (1989) *Nature* **341**, 758-760.

- (53) Fretz, H., Albers, M. W., Galat, A., Standaert, R. F., Lane, W. S., Burakoff, S. J., Bierer, B. E., & Schreiber, S. L. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 1409-1411.
- (54) Shieh, B. -H., Stamnes, M. A., Seavello, S., Harris, G. L., & Zuker, C. S. (1989) *Nature* **338**, 67-70.
- (55) Schneuwly, S., Shortridge, R. D., Laarivee, D. C., Ono, T., Ozaki, M., & Pak, W. L. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5390-5394.
- (56) Bachinger, H. P., & Compton, L. A. (1991) *J. Cell. Biochem. Suppl.* **15G**, 188.
- (57) Noiva, R., & Lennarz, W. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 3553-3556.
- (58) Lyles, M. M., & Gilbert, H. F. (1991) *Biochemistry* **30**, 613-619.
- (59) Lyles, M. M., & Gilbert, H. F. (1991) *Biochemistry* **30**, 619-625.
- (60) Edman, J. C., Ellis, L., Blacher, R. W., Roth, R. A., & Rutter, W. J. (1985) *Nature* **317**, 267-270.
- (61) Tissieres, A., Mitchel, H. K., & Tracy, U. M. (1974) *J. Mol. Biol.* **84**, 389-398.
- (62) Ashburner, M., & Bonner, J. J. (1979) *Cell* **17**, 241-254.
- (63) Kelley, P. M., & Schlesinger, M. J. (1978) *Cell* **15**, 1277-1286.
- (64) Hightower, L. E. (1980) *J. Cell Physiol.* **102**, 407-424.
- (65) Ananthan, J., Goldberg, A. L., & Voellmy, R. (1986) *Science* **232**, 522-524.
- (66) Finley, D., Ciechanova, A., & Varshavsky, A. (1984) *Cell* **37**, 43-55.
- (67) Karlik, C. C., Coutu, M. D., & Fyrberg, E. A. (1984) *Cell* **38**, 711-719.
- (68) Hiromi, Y., Oxamoto, H., Gehring, W. J., & HoHa, Y. (1986) *Cell* **44**, 293-301.
- (69) Morimoto, R. I., Tissieres, A., & Georgopoulos, C. (1990) in "Stress Proteins in Biology and Medicine", pp. 1-36, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- (70) Morimoto, R. I., Tissieres, A., & Georgopoulos, C. (1994) in "The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones", pp. 1-30, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- (71) Parsell, D. A., Sanchez, Y., Stitzel, J. D., & Lindquist, S. (1991) *Nature* **353**, 270-273.
- (72) Gottesman, S., Clark, W. P., & Maurizi, M. R. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 7886-7893.
- (73) Catelli, M. -G., Binart, N., Jung Testas, I., Renoir, J. M., Baulieu, E. -E., & Feramisco, J. R. (1985) *EMBO J.* **4**, 3131-3135.
- (74) Bardwell, J. C. A., & Craig, E. A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5177-5181.
- (75) Normington, K., Kohno, K., Kozutsumi, Y., Gething, M. J., & Sambrook, J. (1989) *Cell* **57**, 1223-1236.
- (76) Munro, S., & Pelham, H. R. B. (1986) *Cell* **46**, 291-300.



- (77) Georgopoulos, C. P., Lam, B., Lundquist-Heil, A., Rudolph, C. F., Yochem, J., & Feiss, M. (1979) *Mol. Gen. Genet.* **172**, 143-149.
- (78) Hendrix, R. W. (1979) *J. Mol. Biol.* **129**, 375-392.
- (79) McMullin, T. W., & Hallberg, R. L. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 371-380.
- (80) Arrigo, A. P., & Landry, J., (1994) in "The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones" , pp. 335-373, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- (81) Jentsch, S. (1992) *Annu. Rev. Genet.* **26**, 179-207.
- (82) Charette, M. F., Henderson, G. W., & Markovitz, A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4728-4732.
- (83) Katayama-Fujimura, Y., Gottesman, S., & Maurizi, M. R. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 4477-4485.
- (84) Tai, P. -K. K., Albers, M. W., Chang, H., Faber, L. E., & Schreiber, S. L. (1992) *Science* **256**, 1315-1318.
- (85) Zylicz, M., Yamamoto, T., McKittrick, N., Sell, S., & Georgopoulos, C. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 7591-7598.
- (86) Natsume, T., Koide, T., Yokota, S., Hirayoshi, K., & Nagata, K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 31224-31228.
- (87) Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D., & Finch, J. T. (1978) *Nature* **275**, 416-420.
- (88) Bohen, S. P., & Yamamoto, K. R. (1994) in "The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones" , pp. 313-334, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- (89) Hendrick, J. P., & Hartl, F. -U. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 349-384.
- (90) Ingolia, T. D., & Craig, E. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2360-2364.
- (91) Sirotkin, K., & Davidson, N. (1982) *Dev. Biol.* **89**, 196-210.
- (92) Fuqua, S. A. W., Blum-Salingaros, M., & McGuire, W. L. (1989) *Cancer Res.* **49**, 4126-4129.
- (93) Merck, K. B., Groenen, P. J. T. A., Voorter, C. E. M., de Haard-Hoekman, W. A., Horwitz, J., Bloemendal, H., & de Jong, W. W. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 1046-1052.
- (94) Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988) *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631-677.
- (95) Rose, D. W., Wettenhall, R. E. H., Kudlicki, W., Kramer, G., & Hardesty, B. (1987) *Biochemistry* **26**, 6583-6587.
- (96) Yamamoto, K. R., (1985) *Annu. Rev. Genet.* **19**, 209-252.
- (97) Rexin, M., Busch, W., & Gehring, U. (1988) *Biochemistry* **27**, 5593-5601.
- (98) Denis, M., & Gustafsson, J. Å. (1989) *Cancer Res.* **49**, 2275s-2281s.
- (99) Raaka, B. M., & Samuels, H. H. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 417-425.

- (100) Pongratz, I., Mason, G. G. F., & Poellinger, L. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 13728-13734.
- (101) Smith, D. F., Stensgard, B. A., Welch, W. J., & Toft, D. O. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 1350-1356.
- (102) Hutchison, K. A., Stancato, L. F., Jove, R., & Pratt, W. B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 13952-13957.
- (103) Miyata, Y., & Yahara, I. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 7042-7047.
- (104) Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R., & Jakob, U. (1992) *Nature* **358**, 169-170.
- (105) Beckmann, R. P., Mizzen, L. A., & Welch, W. J. (1990) *Science* **248**, 850-854.
- (106) Scherer, P. E., Krieg, U. C., Hwang, S. T., Vestweber, D., & Schatz, G. (1990) *EMBO J.* **9**, 4315-4322.
- (107) Skowyra, D., Georgopoulos, C., & Zyllicz, M. (1990) *Cell* **62**, 939-944.
- (108) Chiang, H. -L., Terlecky, S. R., Plant, C. P., & Dice, J. F. (1989) *Science* **246**, 382-385.
- (109) Palleros, D. R., Welch, W. J., & Fink, A. L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5719-5723.
- (110) Sadis, S., Hightower, L. (1992) *Biochemistry* **31**, 9406-9412.
- (111) Schlossman, D. M., Schmid, S. L., Braell, W. A., & Rothman, J. E. (1984) *J. Cell Biol.* **99**, 723-733.
- (112) Braell, W. A., Schlossman, D. M., Schmid, S. L., & Rothman, J. E. (1984) *J. Cell Biol.* **99**, 734-741.
- (113) Palleros, D. R., Reid, K. L., Shi, L., Welch, W. J., & Fink, A. L. (1993) *Nature* **365**, 664-666.
- (114) Schroder, H., Langer, T., Hartl, F. -U., & Bukau, B. (1993) *EMBO J.* **12**, 4137-4144.
- (115) Flynn, G. C., Chappell, T. G., & Rothman, J. E. (1989) *Science* **245**, 385-390.
- (116) Landry, S. J., Jordan, R., McMacken, R., & Gierasch, L. M. (1992) *Nature* **355**, 455-457.
- (117) Blond-Elguindi, S., Cwirla, S. E., Dower, W. J., Lipshutz, R. J., Sprang, S. R., Sambrook, J. F., & Gething, M. J. (1993) *Cell* **75**, 717-728.
- (118) Gragerov, A., Zeng, L., Zhao, X., Burkholder, W., & Gottesman, M. E. (1994) *J. Mol. Biol.* **235**, 848-854.
- (119) Sternberg, N. (1973) *J. Mol. Biol.* **76**, 1-23.
- (120) Sternberg, N. (1973) *J. Mol. Biol.* **76**, 25-44.
- (121) Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., Casjens, S. R., & Kaiser, A. D. (1973) *J. Mol. Biol.* **76**, 45-60.
- (122) Hendrix, R. W. (1979) *J. Mol. Biol.* **129**, 375-392.
- (123) Chandrasekhar, G. N., Tilly, K., Woolford, K., Hendrix, R., & Georgopoulos, C. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 12414-12419.

- (124) Hemmingsen, S. M., Woolford, C., van der Vies, S. M., Tilly, K., Dennis, D. T., Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., & Ellis, R. J. (1988) *Nature* **333**, 330-334.
- (125) Goloubinoff, P., Gatenby, A. A., & Lorimer, G. H. (1989) *Nature* **337**, 44-47.
- (126) Goloubinoff, P., Christeller, J. T., Gatenby, A. A., & Lorimer, G. H. (1989) *Nature* **342**, 884-889.
- (127) Viitanen, P. V., Lubben, T. H., Reed, J., Goloubinoff, P., O'Keefe, D. P., & Lorimer, G. H. (1990) *Biochemistry* **29**, 5665-5671.
- (128) Buchner, J., Schmidt, M., Fuchs, M., Jaenicke, R., Rudolph, R., Schmid, F. X., Kiefhaber, T. (1991) *Biochemistry* **30**, 1586-1591.
- (129) Gray, T. E., & Fersht, A. R. (1993) *J. Mol. Biol.* **232**, 1197-1207.
- (130) Martin, J., Langer, T., Boteva, R., Schramel, A., Horwich, A. L., & Hartl, F. -U. (1991) *Nature* **352**, 36-42.
- (131) Viitanen, P. V., Donaldson, G. K., Lorimer, G. H., Lubben, T. H., & Gatenby, A. A. (1991) *Biochemistry* **30**, 9716-9723.
- (132) Laminet, A. A., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C., & Pluckthun, A. (1990) *EMBO J.* **9**, 2315-2319.
- (133) Mendoza, J. A., Rogers, E., Lorimer, G. H., & Horowitz, P. M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 13044-13049.
- (134) Rosenberg, H. F., Ackerman, S. J., & Tenen, D. G. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 4499-4503.
- (135) Brandsch, R., Bichler, V., Schmidt, M., & Buchner, J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 20844-20849.
- (136) Schmidt, M., & Buchner, J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16829-16833.
- (137) Kawata, Y., Nosaka, K., Hongo, K., Mizobata, T., & Nagai, J. (1994) *FEBS Lett.* **345**, 229-232.
- (138) Holl-Neugebauer, B., Rudolph, R., Schmidt, M., & Buchner, J. (1991) *Biochemistry* **30**, 11609-11614.
- (139) Battistoni, A., Carri, M. T., Steinkuhler, C., & Rotilio, G. (1993) *FEBS Lett.* **322**, 6-9.
- (140) Kern, G., Schmidt, M., Buchner, J., & Jaenicke, R. (1992) *FEBS Lett.* **305**, 203-205.
- (141) Badcoe, I. G., Smith, C. J., Wood, S., Halsall, D. J., Holbrook, J. J., Lund, P., & Clarke, A. R. (1991) *Biochemistry* **30**, 9195-9200.
- (142) Hartman, D. J., Surin, B. P., Dixon, N. E., Hoogenrad, N. J., & Hoj, P. B. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2276-2280.
- (143) Flynn, G. C., Beckers, C. J. M., Baase, W. A., & Dahlquist, F. W. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10826-10830.
- (144) Escher, A., & Szalay, A. A. (1993) *Mol. Gen. Genet.* **238**, 65-73.



- (145) Kubo, T., Mizobata, T., & Kawata, Y. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 19346-19351.
- (146) Hansen, J. E., & Gafni, A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 21632-21636.
- (147) van der Vies, S. M., Viitanen, P. V., Gatenby, A. A., Lorimer, G. H., & Jaenicke, R. (1992) *Biochemistry* **31**, 3635-3644.
- (148) Grimm, R., Donaldson, G. K., van der Vies, S. M., Schafer, E., & Gatenby, A. A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 5220-5226.
- (149) Zheng, X., Rosenberg, L. E., Kalousek, F., & Fenton, W. A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 7489-7493.
- (150) Brunschier, R., Danner, M., & Seckler, R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 2767-2772.
- (151) Wynn, R. M., Davic, J. R., Cox, R. P., & Chuang, D. T. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 12400-12403.
- (152) Mizobata, T., Akiyama, Y., Ito, K., Yumoto, N., & Kawata, Y. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 17773-17779.
- (153) Fisher, M. T., (1992) *Biochemistry* **31**, 3955-3963.
- (154) 河田 康志, 溝端 知宏, 永井 純 (1994) 最新医学 49, 2084-2097.
- (155) Viitanen, P. V., Gatenby, A. A., & Lorimer, G. H. (1992) *Protein Sci.* **1**, 363-369.
- (156) Jackson, G. S., Staniforth, R. A., Halsall, D. J., Atkinson, T., Holbrook, J. J., Clarke, A. R., & Burston, S. G. (1993) *Biochemistry* **32**, 2554-2563.
- (157) Martin, J., Mayhew, M., Langer, T., & Hartl, F. -U. (1993) *Nature* **366**, 228-233.
- (158) Todd, M. J., Viitanen, P. V., & Lorimer, G. H. (1994) *Science* **265**, 659-666.
- (159) Weissman, J. S., Kashi, Y., Fenton, W. A., & Horwich, A. L. (1994) *Cell* **78**, 693-702.
- (160) Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachiniak, A., Horwich, A. L., & Sigler, P. B. (1994) *Nature* **371**, 578-586.
- (161) Wood, W. A., Gunslaus, I. G., and Umbreit, W. W. (1947) *J. Biol. Chem.* **242**, 2800-2809.
- (162) Snell, E. E. (1975) *Adv. Enzymol.* **42**, 287-333.
- (163) Deeley, M. C., & Yanofsky, C. (1981) *J. Bacteriol.* **147**, 787-796.
- (164) Tokushige, M., Tsujimoto, N., Oda, T., Honda, T., Yumoto, N., Ito, S., Yamamoto, M., Kim, E. H., & Hiragi, Y. (1989) *Biochimie* **71**, 711-720.
- (165) Kagamiyama, H., Wada, H., Matsubara, H., & Snell, E. E. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 1571-1575.
- (166) Happold, F. C., & Struyvenberg, A. (1954) *Biochem. J.* **58**, 379-382.
- (167) London, J., Skrzynia, C., & Goldberg, M. E. (1974) *Eur. J. Biochem.* **47**, 409-415.
- (168) Utter, M. F., & Kolenbrander, H. M. (1972) in "The Enzymes" (Boyer, P. D. ed.) vol. 5, pp. 117-168, Academic Press, New York.

- (169) 香月 裕彦, 泉井 桂, 寺岡 弘文, 吉永 侃夫, 森川 実 (1973) *生化学* **45**, 781-803.
- (170) Hatch, M. D., & Slack, C. R. (1970) *Annu. Rev. Plant Physiol.* **29**, 379-414.
- (171) Theodore, T. S. & Englesberg, E. (1964) *J. Bacteriol.* **88**, 946-955.
- (172) Kornberg, H. L. (1965) *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **15**, 8.
- (173) Canvas, J. L., & Kornberg, H. L. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* **96**, 169-172.
- (174) Maeba, P., & Sanwal, B. D. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **21**, 503.
- (175) Izui, K., Nishikido, T., Ishihara, K., & Katsuki, H. (1970) *J. Biochem.* **68**, 215-226.
- (176) Taguchi, M., Izui, K., & Katsuki, H. (1977) *FEBS Lett.* **77**, 270-272.
- (177) Izui, K., Yoshinaga, T., Morikawa, M., & Katsuki, H. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**, 949-956.
- (178) Nishikido, T., Izui, K., Iwatani, A., Katsuki, H., & Tanaka, S. (1968) *J. Biochem.* **63**, 532-541.
- (179) Yoshinaga, T., Teraoka, H., Izui, K., & Katsuki, H. (1974) *J. Biochem.* **75**, 913-924.
- (180) Sabe, H., Miwa, T., Kodaki, T., Izui, K., Hiraga, S., & Katsuki, H. (1984) *Gene* **31**, 279-283.
- (181) Fujita, N., Miwa, T., Ishijima, S., Izui, K., & Katsuki, H. (1984) *J. Biochem.* **95**, 909-916.
- (182) Stryer, L. (1988) "Biochemistry, 3rd Ed." , pp. 32-34, W. H. Freeman and Company, New York.
- (183) Georgopoulos, C., Liberek, K., Zylicz, M., & Ang, D. (1994) in "The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones" , pp. 209-249, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- (184) Langer, T., Pfeifer, G., Martin, J., Baumeister, W., & Hartl, F. -U. (1992) *EMBO J.* **11**, 4757-4765.
- (185) Phillips, R. S., Ravichandran, K., & Von Tersch, R. L. (1989) *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 80-83.
- (186) Simon, E. J., & Shemin, D. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 2520.
- (187) Ellman, G. L., (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70.
- (188) Tani, S., Tsujimoto, N., Kawata, Y., & Tokushige, M. (1990) *Biotech. Appl. Biochem.* **12**, 28-33.
- (189) 溝端 知宏 (1992) 京都大学大学院理学研究科 平成3年度修士学位論文
- (190) 寺田 和豊 (1992) 京都大学大学院理学研究科 平成3年度学位申請論文
- (191) Behbahani-Nejad, I., Dye, J. L., & Suelter, C. H. (1987) *Methods Enzymol.* **142**, 414-422.
- (192) Inoue, M., Hayashi, M., Sugimoto, M., Harada, S., Kai, Y., Kasai, N., Terada, K., & Izui, K. (1989) *J. Mol. Biol.* **208**, 509-510.
- (193) Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

- (194) Suelter, C. H., Wang, J., & Snell, E. E. (1976) *FEBS Lett.* **66**, 230-232.
- (195) Yoshinaga, T., Izui, K., & Katsuki, H. (1970) *J. Biochem.* **68**, 747-750.
- (196) Metzler, C. M., Viswanath, R., & Metzler, D. E. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 9374-9381.
- (197) Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach, P. S., & Candia, O. A. (1979) *Anal. Biochem.* **100**, 95-97.
- (198) Tokushige, M., Iinuma, K., Yamamoto, M., & Nishijima, Y. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**, 863-869.
- (199) Raibaud, O., & Goldberg, M. E. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 3451-3455.
- (200) Skrzynia, C., London, J., & Goldberg, M. E. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 2325-2326.
- (201) Cleland, J. L., & Wang, D. I. C. (1990) *Bio/Technology* **8**, 1274-1278.
- (202) Bancy, F., & Gatenby, A. A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 11637-11644.
- (203) 日本分光学会測定法シリーズ3：蛍光測定－生物科学への応用(1983) (木下一彦, 御橋 廣真 編) pp. 172-174, 学会出版センター刊
- (204) Hayer-Hartl, M. K., & Hartl, F. -U. (1993) *FEBS Lett.* **320**, 83-84.
- (205) Kirsch, J. F., Eichele, G., Ford, G. C., Vincent, M. G., & Jansonius, J. N. (1984) *J. Mol. Biol.* **174**, 497-525.
- (206) Antson, A. A., Demidkina, T. V., Gollnick, P., Dauter, Z., Von Tersch, R. L., Long, J., Berezhnoy, S. N., Phillips, R. S., Harutyunyan, E. H., & Wilson, K. S. (1993) *Biochemistry* **32**, 4195-4206.
- (207) Honda, T., & Tokushige, M. (1986) *J. Biochem.* **100**, 679-685.
- (208) Fisher, M. T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 13629-13636.
- (209) Staniforth, R., Burston, S. G., Atkinson, T., & Clarke, A. R. (1994) *Biochem. J.* **300**, 651-658.
- (210) Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M. K., & Hartl, F. -U. (1992) *Nature* **356**, 683-689.